

**BIOSYNTHESE DES O9-SPEZIFISCHEN POLYSACCHARIDS
VON ESCHERICHIA COLI**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Biologie
der Albert-Ludwigs-Universität
zu Freiburg im Breisgau**

**vorgelegt von
Veronika Winter
aus Markdorf**

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550803_0009

**BIOSYNTHESE DES O9-SPEZIFISCHEN POLYSACCHARIDS
VON ESCHERICHIA COLI**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Biologie
der Albert-Ludwigs-Universität
zu Freiburg im Breisgau



vorgelegt von
Veronika Winter
aus Markdorf

1978

Dekan: Professor Dr. H. Kössel

Leiter der Arbeit: Professor Dr. K. Jann

Referent:

Korreferent:

Tag der Verkündigung des Prüfungsergebnisses:

Teile der Arbeit sind zur Veröffentlichung in Vorbereitung:

"On the Serological Specificity of the E. coli 09 and 08
Antigen". K. Jann, B. Jann, V. Winter, C. Wolf-Ullisch



Herrn Professor Dr. K. Jann, unter dessen Leitung diese Dissertation stand, möchte ich besonders danken für die Anregungen und Förderung im Verlauf der Arbeit und für seine großzügige Hilfsbereitschaft. Dieser Dank gilt auch ganz herzlich Frau Dr. B. Jann.

Herrn Dr. G. Schmidt danke ich für die Bereitstellung und Züchtung der Bakterien und Phagen, ebenso Frau A. Gutmann und Fräulein U. Fischer.

Herrn R. Warth danke ich für die Durchführung der Aminosäureanalysen.

Fräulein C. Heidkämper und Fräulein M. Held danke ich für die vielfache praktische Hilfe, mit der sie mich unterstützt haben.

Mein Dank gilt auch allen Freunden und Kollegen, insbesondere Dr. H.C. Flemming und Dr. S. Kanegasaki, die durch ihre Hilfe und Ratschläge den Fortgang der Arbeit gefördert haben.

Von der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. und der Deutschen Forschungsgemeinschaft wurde die Arbeit finanziell unterstützt.

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Die Bakterienzellwand	1
1.2 Bakterielle Polysaccharide	3
1.2.1 Kapselpolysaccharide	3
1.2.2 Lipopolysaccharide	5
1.2.3 Teichonsäuren	8
1.3 Immunchemie und Immunologie bakterieller Polysaccharide	8
1.3.1 Bakterielle Antigene	8
1.3.2 Antigen determinanten	10
1.3.3 Kreuzreaktionen	11
1.3.4 Serologische Techniken	11
1.4 Polysaccharidantigene bei <u>E. coli</u>	12
1.4.1 Klassifizierung der Polysaccharid-Antigene von <u>E. coli</u> durch Immunelektrophorese	13
1.4.2 Die 08 und 09 Antigene von <u>E. coli</u>	15
1.5 Prinzipien der Polysaccharidbiosynthese	16
1.6 Biosynthese der Lipopolysaccharide	19
1.6.1 Biosynthese des Lipoid A	20
1.6.2 Biosynthese des Kernoligosaccharids	20
1.6.3 Biosynthese der O-spezifischen Polysaccharide	22
1.7 Genetik bakterieller Lipopolysaccharide	25
1.8 Genetik und Biosynthese der O-Antigene 8 und 9 von <u>E. coli</u>	28
1.8.1 Genetik	28
1.8.2 Biosynthese	28
2. Problemstellung und Ziel der Arbeit	30
Untersuchungen und Ergebnisse	
3. Untersuchungen zur serologischen Spezifität des 08 und 09 Antigens	31
3.1 Serologische Identifizierung des <u>in vitro</u> gebildeten Mannans	32
3.2 Auswirkung der Bindung des Polysaccharids an den Carrier auf die serologische Aktivität	35
3.3 Zusammenfassung von Kapitel 3	36

4. Zur Natur des Carriermoleküls	37
4.1 Isolierung des an den Carrier-gebundenen ^{14}C -Mannans nach <u>in vitro</u> Synthese	38
4.1.1 Solubilisierung mit Triton X 100	38
4.1.2 Extraktion mit 45 %igem Phenol bei 4°C	43
4.1.3 Reinigung der Carrier-Mannan-Verbindung durch Affinitätschromatographie	44
4.1.4 Präparative SDS-Polyacrylamid-Gel-elektrophorese der Carrier-Mannan-Verbindung	47
4.2 Aminosäuren-Analyse der aus dem Gel eluierten Carrier-Mannan-Verbindung	48
4.3 Einwirkung von Proteasen auf die Carrier-Mannan-Verbindung	50
4.4 Zusammenfassung von Kapitel 5	51
5. Untersuchungen an einer UDP-Glucose-Pyrophosphorylase-losen Mutante	53
5.1 Isolierung	53
5.2 Bestimmung der UDP-Glucose-Pyrophosphorylase-Aktivität	55
5.3 Bestimmung der Phosphoglucose-Isomerase-Aktivität	56
5.4 Glucosylierung des Carriers	58
5.5 Nachweis von Glucose am 09-Antigen	60
5.6 Zusammenfassung von Kapitel 5	62
6. Extraktion einer an Lipid gebundenen Synthese-Zwischenstufe	63
6.1 Extraktion mit Chloroform-Methanol nach <u>in vivo</u> Inkubation mit ^{14}C -Glucose	64
6.2 Charakterisierung der extrahierten Glucose durch Papierchromatographie	66
6.3 Auftrennung der extrahierten Lipide über DEAE-Cellulose	67
6.4 Zusammenfassung von Kapitel 6	69
7. Rekonstitution des Mannansynthesystems	70
7.1 Zusammenfassung von Kapitel 7	72

8. Biosynthese des 09-Mannans in Zellextrakten	73
8.1 Untersuchungen der Mannansynthese-Aktivität im TX 100-Extrakt	74
8.2 Serologische Untersuchung des im TX 100- Extrakt gebildeten Mannans	75
8.3 Zusammenfassung von Kapitel 8	76
9. Zusammenfassung der Ergebnisse	77
10. Diskussion	79
10.1 Serologische Spezifität des Produkts	79
10.2 Synthesegenauigkeit des Mannansynthese- systems	81
10.3 Mechanismus der 09-Mannan Biosynthese	82
11. Material und Methoden	85
11.1 Bakterien	85
11.2 Phagen	85
11.3 Nährmedien	86
11.3.1 A 3-Medium	86
11.3.2 L-Broth mit 5 % Glucose	86
11.3.3 Loeb-Medium	87
11.3.4 Loeb-Agar	87
11.4 Seren	87
11.4.1 Anti 09-Antiserum	87
11.4.2 Anti 08-Antiserum	87
11.4.3 Normalserum	87
11.4.4 Anti-Kaninchen-Gamma-Globulin-Serum	88
11.5 Puffer	88
11.5.1 Tris-Puffer	88
11.5.2 Puffer zur Chromatographie an Sephadex G 200	88
11.5.3 Puffer zur Desintegration des TX 100- Extraktes	88
11.5.4 Puffer für die Affinitätschromatographie	88
11.5.5 Puffer für die Chromatographie an DEAE- Cellulose	89
11.6 Laufmittelgemische für die Papierchromatographie	89

11.7	Bestimmung des Einbaus radioaktiver Substanzen	89
11.7.1	Verwendete radioaktiv markierte Verbindungen	89
11.7.2	Gerät	89
11.7.3	Szintillationsflüssigkeit	89
11.7.4	Vorbereitung der Proben und Messung	90
11.8	Herstellung von Enzympräparationen	90
11.8.1	EDTA-Präparationen	90
11.8.2	Membranpräparationen	91
11.9	In vitro-Inkubationsansatz	93
11.9.1	Analytisch	93
11.9.2	Präparativ zur Gewinnung von Produkt	94
11.10	Produktkontrolle	94
11.10.1	Phenol-Wasser-Extraktion im Mikromaßstab	94
11.10.2	Präzipitation mit Essigsäure	94
11.11	Isolierung des Produkts durch Phenol-Wasser-Extraktion bei 65°C	95
11.12	Reinigung des Produkts durch Gelchromatographie	95
11.12.1	Abgespaltenes Produkt	95
11.12.2	An den Carrier gebundenes Produkt	96
11.13	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	96
11.13.1	Desintegrationssystem	96
11.13.2	Gelelektrophorese	96
11.13.3	Auswertung der Gele	97
11.13.4	Präparative Gelelektrophorese	98
11.14	Extraktion des an den Carrier gebundenen Mannans	99
11.14.1	Extraktion mit Triton X 100	99
11.14.2	Phenol-Wasser-Extraktion bei 4°C	100
11.15	Affinitätschromatographie	101
11.16	Aminosäurenanalyse	101
11.17	Einwirkung von Proteasen	102
11.18	Isolierung der Mutanten F 988	102
11.19	Enzymtests	103
11.19.1	Test auf UDP-Glucose-Pyrophosphorylase-Aktivität	103
11.19.2	Test auf Phosphoglucoseisomerase-Aktivität	103

11.20	Identifizierung von Glucose am 09-Mannan	104
11.21	Extraktion und Identifizierung lipoidgebundener Glucose	105
11.21.1	Extraktion	105
11.21.2	Identifizierung	105
11.22	Chromatographie von Lipoiden an DEAE-Cellulose	106
11.23	Rekonstitution des Mannan-Synthesystems	106
11.23.1	Wässrige Suspension des Lipoidextraktes	106
11.23.2	Membranpräparation	107
11.23.3	Integration der Lipoid-Zwischenstufe in die Membran	107
11.24	Antigenbindungstest	107
11.24.1	Vorbereitung der Proben	108
11.24.2	Durchführung des Tests	108
12.	Literaturangaben	110

ABKÜRZUNGEN

Abe	Abequose
Ac	Acetyl
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CDP	Cytidindiphosphat
cmp	counts per minute
Core	Kernoligosaccharid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EA	Äthanolamin
Fru	Fructose
Gal	Galactose
galU	Genort für UDP-Glucose-Pyrophosphorylase
GDP	Guanosindiphosphat
Glc	Glucose
GlcN	Glucosamin
Hep	Heptose
Hepes	N-2'-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure
KDO	2-Keto-3-desoxy-octonsäure
LPS	Lipopolysaccharid
Man	Mannose
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NADP ^H	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert
NDP	Nucleosiddiphosphat
NMP	Nucleosidmonophosphat
P	Phosphat, Phosphoryl-
pgi	Genort für Phosphoglucose-Isomerase
pmi	Genort für Phosphomannose-Isomerase
PP	Pyrophosphat, Pyrophosphoryl-
R	Rauh-Form
Rha	Rhamnose
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Glatt-Form
SDS	Natriumdodecylsulfat

SR	Semi-Rauh-Form
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TX 100	Triton X 100
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat

1. Einleitung

1.1 Die Bakterienzellwand

Die Zellwand von Prokaryonten bildet eine funktionelle biologische Einheit von hoher Komplexität. Sie erfüllt Schutz-, Transport-, Erkennungs-, und Synthesefunktionen und ermöglicht es der Zelle dadurch, in sehr unterschiedlicher Umgebung zu leben. Der Zusammenhang zwischen chemischer Struktur und biologischer Bedeutung, sowie Stoffwechsel und Synthese der Zellwandbestandteile, werden schon seit langem untersucht.

Bakterien sind von einer festen Stützschiicht (Murein) umgeben, die der Zelle ihre Form gibt (Braun, 1973) und sie gegen Verletzungen durch mechanische Einwirkungen oder osmotische Veränderungen schützt. Das Murein (Peptidoglycan, Mucopetidin) umspannt als ein Riesenmolekül (Mureinsacculus) die gesamte Zelle (Ghuysen et al., 1968). Es besteht aus N-Acetyl-Glucosamin und N-Acetyl-Muraminsäure, welche alternierend über β -(1.4)-Bindungen ein Glycanpolymeres bilden. Am 3-O-Lactylrest der Muraminsäure sind Oligopeptide amidisch gebunden (Salton et al., 1971). Mit jeder zehnten bis zwölften Disaccharideinheit des Mureins ist ein Lipoproteinmolekül verknüpft (Braun, 1973).

Die Bakterien lassen sich in zwei Hauptklassen unterteilen: Bakterien, die auf die Gramfärbung positiv reagieren und solche die negativ reagieren. Die Ursache für das unterschiedliche Färbeverhalten liegt in dem verschiedenen Aufbau der Zellwand (s. Abb. 1).

Gram-positive Bakterien haben eine sehr dicke (20-80 nm) Zellwand (Braun und Hantke, 1974). Sie besteht aus mehreren Schichten von stark vernetztem Murein und einem oder mehreren zusätzlichen Heteropolysacchariden, die an die Glycankette des Peptidoglycans kovalent gebunden sind (Ghuysen et al.,

1968). Häufig enthält die Gram-positive Zellwand auch Teichonsäuren. Das sind Polymere der Ribitphosphorsäure und der Glycerophosphorsäure, die über Phosphodiesterbrücken mit der Muraminsäure verknüpft sind.

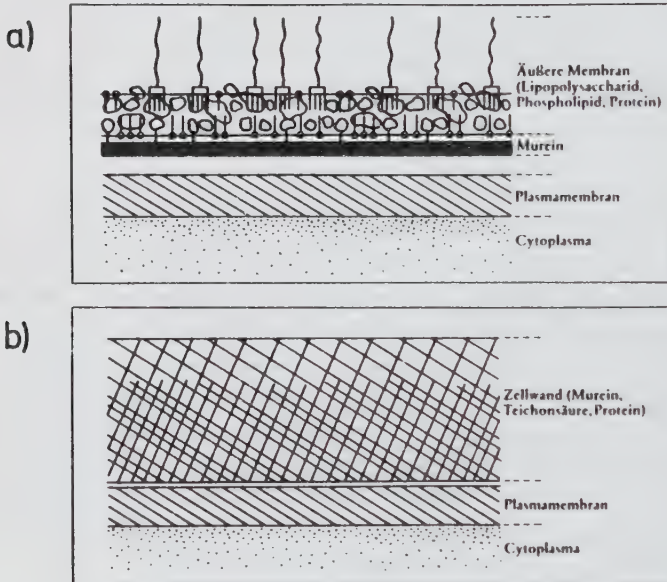


Abb. 1: Vereinfachtes Schema der Zellwand von Gram-positiven (a) und Gram-negativen (b) Bakterien. (Costerton et al., 1974; Schnaitmann, 1971; Mühlradt, 1975)

Der Aufbau der Zellhülle Gram-negativer Bakterien ist wesentlich komplexer. Sie besteht aus drei übereinanderliegenden Schichten (Bladen und Mergenhagen, 1964): der zytoplasmatischen Membran, einer dünnen (2-3 nm) Mureinschicht und der äußeren Membran.

Die äußere Membran enthält Protein, Phospholipoide, Lipoprotein und Lipopolysaccharid (Nikaido, 1973). Sie bildet eine hydrophobe Barriere, ist jedoch keine Biomembran wie sie am "fluid mosaic"-Membran-Modell (Singer und Nicolson, 1972) beschrieben wird. Es liegt wahrscheinlich keine Phospholipid-Doppelschicht (bilayer) vor (Kamio und Nikaido, 1976). Nach einem Modell von Smit kommen Phospholipoide (und Protein) nur auf der Innenseite dieser Membran vor, während die Außenseite hauptsächlich aus Lipopolysaccharid und Protein besteht (Smit et al., 1975).

Der bakteriellen Zellwand sind oft noch weitere extrazelluläre Schichten aufgelagert, die als Kapseln oder Schleime bezeichnet werden (Wilkinson, 1958).

1.2 Bakterielle Polysaccharide

Die bakteriellen Polysaccharide befinden sich auf der Zelloberfläche. Es gibt Polysaccharide, die als Kapsel (Kapselpolysaccharide) auf der äußeren Membran aufliegen und solche die integrale Bestandteile der Zellwand sind (Lipopolysaccharide, Teichonsäuren). Kapsel- und Zellwandpolysaccharide erscheinen oft gemeinsam in der gleichen Zelle. Charakteristisch ist für beide Typen von Polysacchariden, daß sie eine geordnete Struktur besitzen, die aus sich wiederholenden Oligosaccharideinheiten (repeating units) besteht. Darin unterscheiden sie sich von den Polysacchariden höherer Organismen, deren Struktur häufig unregelmäßig ist.

1.2.1 Kapselpolysaccharide

Bakterienkapseln bestehen im allgemeinen aus sauren Polysacchariden. Viele lassen sich elektronenmikroskopisch mit

Ruthenium-Rot sichtbar machen. Durch Waschen oder Erhitzen der Bakterien können Kapseln oft leicht von der Oberfläche entfernt werden. Kapselpolysaccharide besitzen ein hohes Molekulargewicht. Die Anzahl der Wiederholungseinheiten ist wesentlich größer als bei Lipopolysacchariden.

Nach ihrem Molekulargewicht und nach charakteristischen Zuckerzusammensetzungen lassen sie sich in drei Gruppen einteilen:

Es gibt hochmolekulare (10^5 - 3×10^5 Dalton) saure Polysaccharide, die Aminosucker, meist Galactosamin oder Glucosamin enthalten. Dieser Typ von Kapselpolysaccharid kommt bei Pneumococcus und E.coli 08 und 09 vor. Bei Klebsiella und ebenfalls bei E.coli 08 und 09 werden hochmolekulare (3×10^5 - 10^6 Dalton) saure Polysaccharide gefunden, die an Lipoid A gebunden sind und keine Aminosucker enthalten. Als dritte Gruppe gibt es bei vielen E. coli Stämmen niedermolekulare (5×10^4 Dalton) saure Polysaccharide, die häufig als saure Zucker N-Acetyl-Neuraminsäure oder N-Acetyl-Mannosaminuronsäure enthalten (Ørskov und Jann, 1977).

Tabelle 1 zeigt die Struktur der Wiederholungseinheiten einiger Kapselpolysaccharide.

Antigen	Wiederholungseinheit	Zitat
K 29 (A)	$\begin{array}{c} \xrightarrow{2} \text{Man} \xrightarrow{1.3} \text{Glc} \xrightarrow[8]{1.6} \text{GlcUA} \xrightarrow[8]{1.3} \text{Gal} \xrightarrow{1} \\ \text{Pyruvat} \xrightarrow[6]{4} \text{Glc} \xrightarrow[8]{1.2} \text{Man} \end{array}$	Le-Ba Nhan et al. 1971, Fehmel et al. 1975
K 30 (A)	$\xrightarrow{3} \text{Man} \xrightarrow{1.2} \text{GlcUA} \xrightarrow[8]{1.3} \text{Gal} \xrightarrow{1}$	Hungerer et al. 1967
K 85 (B)	$\begin{array}{c} \xrightarrow{2} \text{GlcUA} \xrightarrow[1.4]{1.2} \text{Man} \xrightarrow{1.3} \text{Man} \xrightarrow{1.3} \text{GlcNAc} \xrightarrow{1} \\ \uparrow \\ \text{L-Rha} \end{array}$	Jann et al. 1971

Die Kapseln schützen Bakterien gegen den Angriff von Bakteriophagen und gegen Phagozytose. Bekapselte Bakterien inaktivieren durch ihre Ladung Komplement. Dies ist ein Grund für ihre erhöhte Virulenz (Howard, Glynn, 1971).

1.2.2 Lipopolysaccharide

Lipopolysaccharide befinden sich in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, wo sie Komplexe mit Protein und Phospholipoid bilden (Rothfield und Romeo, 1971). Sie wirken als antigene Strukturen (O-Antigene) und stellen die chemische Grundlage für die serologische Klassifizierung der Gram-negativen Bakterien dar (Kauffmann, 1961).

Die bakteriellen Lipopolysaccharide sind nach einem gemeinsamen Bauprinzip aufgebaut und bestehen aus drei Regionen verschiedener Struktur (Lüderitz et al., 1971).

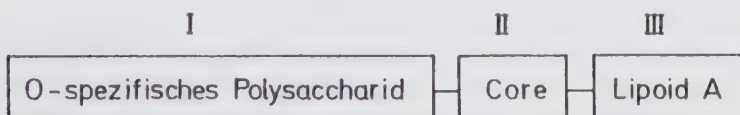


Abb. 2: Strukturprinzip der Lipopolysaccharide

Region I ist das O-spezifische Polysaccharid, das aus sich wiederholenden Oligosaccharideinheiten besteht. Es gibt sehr viele verschiedene O-spezifische Polysaccharide, die sich in Zuckerzusammensetzung, -sequenz, anomerer Konfiguration und Bindungsart unterscheiden. Sie sind Träger der serologischen Spezifität und sind auch verantwortlich für die Phagenrezeptoreigenschaften der Lipopolysaccharide. In Tabelle 2 sind die Wiederholungseinheiten von O-spezifischen Polysacchariden verschiedener Bakterienstämme aufgeführt.

Tab. 2:

Stamm	Wiederholungseinheit	Zitat
<i>S. typhimurium</i>	$ \begin{array}{c} 2\text{-OAc-Abe} \\ \downarrow 1.3 \\ \xrightarrow{2} \text{Man} \xrightarrow{1.4} \text{Rha} \xrightarrow{1.3} \text{Gal} \xrightarrow{1} \text{Glc} \end{array} $	Hellerqvist et al. 1968
<i>S. anatum</i>	$ \begin{array}{c} \xrightarrow{6} \text{Man} \xrightarrow{1.4} \text{Rha} \xrightarrow{1.3} \text{Gal} \xrightarrow{1} \text{Glc} \\ \vdots \\ (\text{O-Ac}) \end{array} $	Robbins, Uchida 1962
<i>E. coli</i> O8	$ \xrightarrow{3} \text{Man} \xrightarrow{1.2} \text{Man} \xrightarrow{1.2} \text{Man} \xrightarrow{1} \text{Glc} $	Reske, Jann 1972

Region II, das Kernoligosaccharid, ist mit Region I verbunden. Es besteht aus zwei Bereichen, a) einem Hexose-Pentasaccharid (äußerer core) und b) einem Oligosaccharid, das aus Heptose und 2-Keto-3-desoxyoctonsäure aufgebaut ist (innerer core). Bei den Lipopolysacchariden der Salmonellen ist die Struktur des Core-Oligosaccharids identisch. In Abb. 3 ist diese Struktur dargestellt. Die Region II trägt die serologische Spezifität der R-Antigene (siehe 1.3), bei denen kein O-spezifisches Polysaccharid mehr vorhanden ist.

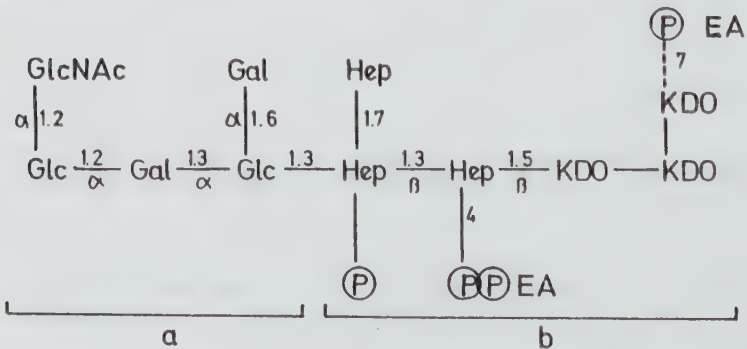


Abb. 3: Struktur des Salmonella-Core (Lüderitz et al., 1973)

Region III, der Lipoid A-Teil ist Bestandteil der äußeren Membran. Die Struktur von Lipoid A (Abb. 4) ist bei allen bisher untersuchten Enterobacteriaceen gleich. (Hase und Rietschel, 1976). Das Grundgerüst bildet ein Glucosamin-disaccharid, dessen Hydroxylgruppen mit langkettigen Fettsäuren substituiert sind. An die Aminogruppen ist im allgemeinen β -Hydroxymyristinsäure gebunden. Glucosamin ist über einen Phosphodiester mit Amino-Arabinose und über eine glykosidische Pyrophosphatbrücke mit Athanolamin verbunden.

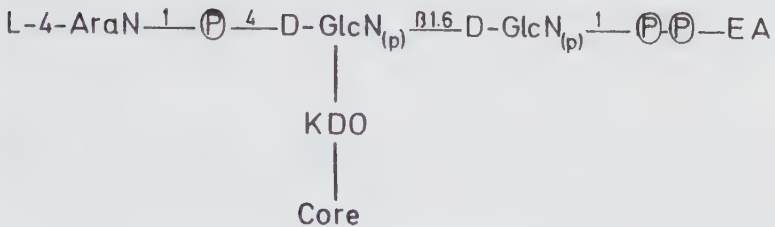


Abb. 4: Struktur des Lipoid A (Rietschel et al., 1972)

Der Lipoid A-Teil (Endotoxin) ist für die Fiebererregung, allergische Reaktionen und Mitogenität verantwortlich (Novotny, 1969).

Die strukturelle Verschiedenheit der Lipopolysaccharide verschiedener Bakterienstämme nimmt von Region III nach Region I stark zu.

1.2.3 Teichonsäuren

In der Zellwand Gram-positiver Bakterien wurden neben dem Murein zusätzlich kovalent gebundene Polysaccharide gefunden: die Teichonsäuren. Sie entsprechen dem Lipopolysaccharid der Gram-negativen Bakterien. Nach Baddiley (1962, 1968) werden sie in drei Strukturtypen unterteilt:

- a) Polymere aus Glycerophosphat (1.3 gebunden)
- b) Polymere aus Ribitolphosphat (1.5 gebunden) und
- c) Copolymere aus Zuckereinheiten und Glycerol- oder Ribitolphosphat.

a) und b) tragen Glucosyl- und Alanylsubstituenten. Ihr immunologisch bedeutsamster Teil ist der Glucosylsubstituent. Teichonsäuren besitzen wie Lipopolysaccharide serologische und Phagenrezeptor-Eigenschaften (Knox und Wicken, 1973). Eine wichtige Funktion von Teichonsäuren besteht darin, durch ihre hohe Ionendichte an der Membran ein Kationengleichgewicht zu erhalten (Heptinstall et al., 1970). Besondere Bedeutung hat dabei die Bindung von Mg^{2+} , das für die Aktivität vieler membrangebundener Enzyme erforderlich ist. Tomasz (1967, 1975) fand, daß in Abwesenheit von Teichonsäuren Zellen zwar geteilt aber nicht voneinander getrennt werden.

1.3 Immunchemie und Immunologie bakterieller Polysaccharide

1.3.1 Bakterielle Antigene

Bakterielle Polysaccharide induzieren bei Tieren und Menschen die Bildung von Antikörpern, d.h. sie sind Antigene. Neben der Fähigkeit, Antikörperbildung zu induzieren, der Immunogenität, reagieren Antigene auch mit diesen Antikörpern, d.h. sie besitzen Antigenspezifität. Aufgrund dieser Spezifität sind sie in verschiedene Antigengruppen unterteilt.

In der äußeren Membran der Gram-negativen Bakterien verankert, finden wir Oberflächenantigene (O-Antigene). Die immunchemisch und immunologisch genau untersuchten O-Antigene sind die Lipopolysaccharide (Lüderitz et al., 1966, 1970, 1971; Jann und Westphal, 1975).

Die O-Spezifität wird durch den Polysaccharidanteil (Region I) bestimmt. Ob das Lipopolysaccharid vollständig gebildet wird oder nicht, drückt sich in der Morphologie der Bakterienkolonien auf Agar aus. Bei vollständigem O-Antigen sind die Bakterienkolonien glatt und glänzend (smooth), sie werden S-Formen genannt. Fehlt das O-spezifische Polysaccharid (Region I), so erscheinen die Kolonien rau und werden R-Formen genannt. Bei ihnen trägt das Kernoligosaccharid, das bei den Glattformen kryptisch ist, die serologische Spezifität (R-Spezifität). Es gibt auch eine Zwischenform, bei der nur eine Wiederholungseinheit des O-Polysaccharids am Kernoligosaccharid gebunden ist, die S-R-Form.

Die sehr große Anzahl der O-Antigene bei Salmonellen wurde nach Serotypen, die durch gemeinsame Determinanten charakterisiert sind, im Kauffmann-White-Schema geordnet (O-Spezifität 1,2,3...) und nach serologischen O-Gruppen (A,B,C...) zusammengefaßt (Kauffmann, 1961). Auch bei E. coli wurde eine große Anzahl von O-Spezifitäten gefunden, während bei Klebsiella nur zwölf O-Gruppen (meist Homopolysaccharide) bekannt sind.

Für die R-Spezifität wurden bei E. coli bisher fünf verschiedene Core-Oligosaccharide gefunden, während Salmonella und vermutlich auch Klebsiella nur eines besitzen. Eine weitere Variation der R-Spezifität kann durch Mutationen hervorgerufen werden, die zu einem inkompletten Kernoligosaccharid führen.

Die Kapselpolysaccharide wirken ebenfalls als Antigene und tragen eine eigene zusätzliche serologische Spezifität (K-Spezifität). Die besonders häufig bei Pneumococcus, E.coli und Klebsiella vorkommenden Kapselpolysaccharide verhindern die serologische Reaktion mit den darunterliegenden O- und R-Antigenen. Die Agglutination mit dem spezifischen O-, bzw. R-Serum kann dann erst nach Vorbehandlung, zum Beispiel durch Erhitzen, erfolgen.

Bei Pneumococcus und Klebsiella gibt es sehr viele verschiedene Kapselantigene. So ist für Klebsiella die serologische Individualität vorwiegend durch die K-Spezifität der über 80 verschiedenen Typen bestimmt, und nicht wie bei Salmonella vorwiegend durch die O-Antigene (Jann und Westphal, 1975).

1.3.2 Antigendeterminanten

Voraussetzung für die spezifische Antigen-Antikörperreaktion ist die Erkennung von Teilstrukturen des Polysaccharidantigens durch das Antikörpermolekül. Diese Teilstrukturen (Determinante Gruppen oder Antigendeterminanten) können die Größe von Oligosacchariden haben, oder sogar nur einzelne Zucker (immundominante Zucker) sein. Die Immundeterminanten sind die chemische Grundlage der serologischen Einteilung von Antigenen (Lüderitz et al., 1966).

Die Antigenspezifität von Polysacchariden konzentriert sich um eine Zuckereinheit und erstreckt sich dann auf dem Polysaccharid über verschieden lange Bereiche. Der immundominante Zucker kann terminal, am nichtreduzierenden Ende, oder in der Zuckerkette stehen. Die anomere Konfiguration und die Bindung haben einen großen Einfluß auf die Antigenspezifität. Ein Polysaccharid kann mehrere verschiedene Antigendeterminanten

haben: sowohl unterschiedliche Zucker, als auch ein und derselbe Zucker in unterschiedlicher Bindung.

Bei Polymeren kann sich die serologische Spezifität nicht nur in der Primärstruktur ausdrücken (Sequenzdeterminanten, Sela et al., 1967), sondern auch durch die Sekundärstruktur, d. h. durch bestimmte räumliche Konstellationen bedingt sein (Konformationsdeterminanten, Sela et al., 1967). Während dies für Proteine bekannt ist (Sela et al., 1967; Shapira und Arnon, 1969; Arnon und Neurath, 1970; Young und Leung, 1970) hat man Konformationsdeterminanten bei Polysacchariden noch nicht nachgewiesen. Es ist allerdings gezeigt worden, daß Polysaccharide Überstrukturen annehmen (Rees, 1972; Wolf et al., 1978).

1.3.3 Kreuzreaktionen

Antikörper reagieren außerordentlich spezifisch auf Antigene. Dennoch fand man, daß es Antikörper gibt, die mit den Antigenen von verschiedenen Bakterien reagieren. Solche Reaktionen werden Kreuzreaktionen genannt. Sie beruhen darauf, daß es Partialstrukturen gibt, die in den Antigenen verschiedener Bakterienstämme identisch sind. Diese Antigene besitzen also die gleichen determinanten Gruppen. Kreuzreaktionen sind die Grundlage jeder serologischen Systematik (Kauffmann, 1961; Heidelberger, 1960; Heidelberger und Nimmich, 1976).

1.3.4 Serologische Techniken

Zur Identifizierung und Klassifizierung von Antigenen wird, wie z.B. bei Kreuzreaktionen, die spezifische Reaktion eines Antigens mit dem Antikörper verwendet. Um diese Reaktion zu verfolgen wurden verschiedene Techniken entwickelt. Sie beruhen darauf, daß Antigene mit Antikörpern Aggregate bil-

den können, die dann präzipitieren. Diese Präzipitation kann in Gelen sichtbar gemacht werden. Das wird bei der Diffusionsmethode von Ouchterlony angewandt (Ouchterlony, 1958).

Bei der Immunelektrophorese (Hirschfeld, 1960) werden die Antigene zunächst aufgrund ihrer Ladung und ihrer Größe elektrophoretisch getrennt und dann durch Antikörper spezifisch erkannt und präzipitiert.

Der Antigenbindungstest beruht auf der Kopräzipitation des Antigen-Antikörperkomplexes mit Ammoniumsulfat (Minden und Farr, 1973) oder mit Serum, das gegen die Antikörper gerichtet ist (Minden et al., 1969; Rüde et al., 1971). Dabei wird der antigegebundene Antikörper zusammen mit dem freien Immunglobulin durch ein Anti-Globulin-Serum präzipitiert. Wenn radioaktiv markiertes Antigen verwendet wurde, kann über die Aktivität des Präzipitats die Bindungsaffinität des Antigens zu dem eingesetzten Antikörper gemessen werden.

Die Reaktion von Antikörpern mit hochmolekularen (multivalenten) löslichen Antigenen führt zur Präzipitation. Reagieren dagegen Antikörper mit Zellen oder großen Partikeln, gegen deren Oberflächenantigene sie gerichtet sind, so führt das zur Agglutination. Neben der Agglutination von Bakterien wird häufig auch die passive Hämagglutination angewendet (Lüderitz et al., 1957). Dabei werden Erythrozyten mit Antigenen beladen und die Agglutination dieser so modifizierten Partikel mit dem entsprechenden Serum wird bestimmt.

1.4 Polysaccharidantigene bei E. coli

Bei der Untersuchung der Polysaccharid-Antigene von E. coli wurden bisher über 150 serologische Antigengruppen gefunden (Kauffmann, 1961). Analysen von Lipopolysacchariden ergaben,

daß es drei chemische Typen von O-spezifischen Polysacchariden gibt: neutrale Homopolysaccharide, neutrale Heteropolysaccharide und saure Heteropolysaccharide (Jann und Westphal, 1975; Ørskov et al., 1977).

Stämme mit sauren Lipopolysacchariden zeigen zum Teil Kreuzreaktion mit Stämmen von Shigella, die ebenfalls saure Polysaccharide besitzen. Ähnlich wie Salmonella und im Gegensatz zu Klebsiella mutieren E. coli Stämme während der Züchtung leicht zu R-Formen. Viele E.coli Stämme tragen zusätzlich Kapselantigene. In einigen Stämmen sind die Kapseln so dick und stark entwickelt wie bei Klebsiella-Arten, in anderen können sie nicht sichtbar gemacht, sondern nur serologisch nachgewiesen werden (Ørskov et al., 1977).

1.4.1 Klassifizierung der Polysaccharidantigene von E.coli durch Immunelektrophorese

Eine relativ einfache und gute Methode die Polysaccharid-Antigene von E. coli zu klassifizieren, ist die Immunelektrophorese. Dabei reagieren antigenhaltige Extrakte von Bakterien mit anti-O und anti-OK-Seren (Ørskov et al., 1971). Die Vielfalt der Serotypen konnte nach ihrem Immunelektrophoreseverhalten in vier Gruppen eingeteilt werden, wie in Abb. 5 gezeigt.

	a		b		c		d	
	+	-	+	-	+	-	+	-
anti-O								
anti-OK								
E.coli Stämme	01:K1	015:K14	09:K29	08:K27	055:K59		0136:K78	
	07:K7	021:K20	09:K30	08:K40	0128:K67		0112:K66	

Abb. 5: Immunelektrophoreseverhalten der Extrakte einiger E. coli Stämme (Ørskov et al., 1971)

Wenn die Ergebnisse der Immunelektrophorese mit den Informationen aus den chemischen und serologischen Untersuchungen kombiniert werden, können die in der Immunelektrophorese verschieden wandernden Antigene folgendermaßen beschrieben werden:

Die zu Immunelektrophoresegruppe a) gehörenden Bakterien besitzen ein neutrales O-antigenes Lipopolysaccharid mit Heteropolysacchariden als O-spezifischen Anteil und ein saures Kapselpolysaccharid, das ein relativ niederes Molekulargewicht hat (d.h. relativ weite Wanderung in der Elektrophorese). Dieses Elektrophoreseverhalten tritt bei E. coli Stämmen von vielen O-Gruppen auf, besonders bei Gruppen mit niederen Nummern (häufig und früh entdeckt).

Die Immunelektrophoresegruppe b) enthält E. coli Stämme der O-Gruppen 8 und 9, deren O-Polysaccharide Homopolysaccharide aus Mannose sind. Zusätzlich enthalten diese Stämme noch saure K-antigene Polysaccharide mit hohem Molekulargewicht (b 1), oder saure Lipopolysaccharide (b 2).

Bei den in Gruppe c) zusammengefaßten Bakterien wird nur ein neutrales Lipopolysaccharid gefunden und Bakterien der Gruppe d) werden charakterisiert durch saure Lipopolysaccharide. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

a	b 1	b 2	c	d
neutrales Lipopolysaccharid (hetero-)	neutrales Lipopolysaccharid (homo-)	neutrales Lipopolysaccharid (homo-)	neutrales Lipopolysaccharid (hetero-)	
saures Kapselpolysaccharid (hetero/homo-)	saures Kapselpolysaccharid (hetero-)	saures Lipopolysaccharid (hetero-)		saures Lipopolysaccharid (hetero-)

Tab. 3: Antigengruppen bei E. coli, eingeteilt nach dem Immunelektrophoreseverhalten (Jann und Jann, 1977).

1.4.2 Die 08 und 09 Antigene von E. coli

Die 0-Antigene 8 und 9 sind die bislang einzigen bei E. coli gefundenen Homopolysaccharide. Sie sind α -Mannane mit sehr ähnlicher Struktur. Zusammen mit den (Lipo)-Polysacchariden von Klebsiella 03 und 05 bilden sie eine Gruppe eng verwandter Mannane. Die Strukturen des 09-Mannans von E. coli (Prehm et al., 1976) und des 03-Mannans von Klebsiella (Curvall et al., 1973) sind identisch. Zwischen den Strukturen der 0-Antigene von E. coli 08 (Reske und Jann, 1972) und Klebsiella 05 (Lindberg et al., 1972) gibt es nur geringe Unterschiede. Tabelle 4 zeigt einen Überblick über die Strukturen der genannten Antigene.

Tab. 4:

Stamm	Wiederholungseinheit
<u>E. coli</u> 08	$\frac{3}{\alpha} \rightarrow \text{Man} \xrightarrow{\frac{1,2}{\alpha}} \text{Man} \xrightarrow{\frac{1,2}{\alpha}} \text{Man} \xrightarrow{\frac{1}{\alpha}}$
<u>E. coli</u> 09	$\frac{3}{\alpha} \rightarrow \text{Man} \xrightarrow{\frac{1,2}{\alpha}} \text{Man} \xrightarrow{\frac{1,2}{\alpha}} \text{Man} \xrightarrow{\frac{1,2}{\alpha}} \text{Man} \xrightarrow{\frac{1,3}{\alpha}} \text{Man} \xrightarrow{\frac{1}{\alpha}}$
<u>Klebsiella</u> 03	$\frac{3}{\alpha} \rightarrow \text{Man} \xrightarrow{\frac{1,2}{\alpha}} \text{Man} \xrightarrow{\frac{1,2}{\alpha}} \text{Man} \xrightarrow{\frac{1,2}{\alpha}} \text{Man} \xrightarrow{\frac{1,3}{\alpha}} \text{Man} \xrightarrow{\frac{1}{\alpha}}$
<u>Klebsiella</u> 05	$\frac{3}{\alpha} \rightarrow \text{Man} \xrightarrow{\frac{1,2}{\alpha}} \text{Man} \xrightarrow{\frac{1,2}{\alpha}} \text{Man} \xrightarrow{\frac{1,3}{\alpha}} \text{Man} \xrightarrow{\frac{1,2}{\alpha}} \text{Man} \xrightarrow{\frac{1}{\alpha}}$

Mit den 0-Antigenen von E. coli 09 und Klebsiella 03 sowie mit denen von E. coli 08 und Klebsiella 05 gibt es Kreuzreaktionen, während zwischen den 0-Antigenen 8 und 9 von E. coli keine Kreuzreaktion stattfindet.

Im Gegensatz zu allen anderen bisher untersuchten Lipopolysacchariden verlieren die 0-Antigene 8 und 9 von E. coli und 3 und 5 von Klebsiella ihre 0-Spezifität, wenn sie mit

milder Säure behandelt werden. Dabei wird der O-antigene Polysaccharidanteil von Core-Lipoid A abgespalten.

Normalerweise können O- und K-Antigene in beliebigen Kombinationen auf einer E. coli-Zelle vorkommen. Ausnahmen bilden jedoch hochmolekulare saure Lipopolysaccharide, die den Kapselpolysacchariden von Klebsiella ähnlich sind und hochmolekulare saure Polysaccharide, die den Kapselpolysacchariden von Pneumococcus ähneln. Beide Typen von Kapselantigenen kommen nur bei den Serotypen 08 und 09 von E. coli vor.

1.5 Prinzipien der Polysaccharid-Biosynthese

Die Biosynthese von Polysacchariden ist ein komplexer Vorgang und erfolgt in mehreren Abschnitten. Der erste Teilvorgang ist die Aktivierung von Zuckerbausteinen. Daran schließen sich dann Umwandlungsreaktionen aktivierter Zucker und schließlich erfolgt der Einbau der aktivierten Zuckerbausteine in das Polymere.

Da zur Knüpfung von Glycosidbindungen Energie benötigt wird, wird das Monosaccharid zunächst in eine am C1-Atom aktivierte Form überführt. Die Bildung der aktivierten Zucker verläuft im allgemeinen so, daß durch eine Pyrophosphorylase aus Zucker-1-Phosphat und Nucleosidtriphosphat ein Nucleosiddiphosphatzucker (Nucleotidzucker) gebildet wird (Leloir, 1964). Die folgende Reaktionsgleichung zeigt das am Beispiel der Glucose:



Die Zucker-1-Phosphate, welche zu Nucleotidzuckern umgesetzt werden, entstehen normalerweise über Fructose-6-Phosphat aus dem allgemeinen Kohlehydratstoffwechsel der Zelle wie in Abbildung 6 gezeigt.

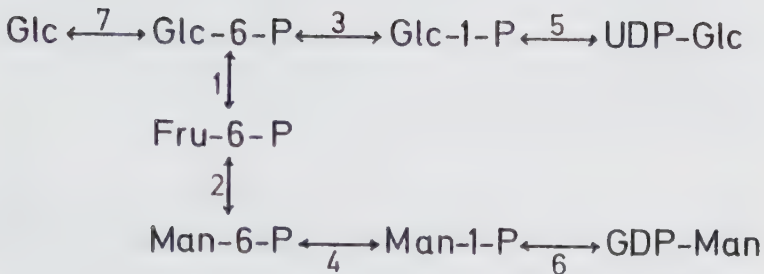


Abb. 6: Nucleotidzuckerstoffwechsel in Gram-negativen Bakterien (Ginsburg, 1964)

- 1 = Phosphoglucoseisomerase
- 2 = Phosphomannoseisomerase
- 3 = Phosphoglucosemutase
- 4 = Phosphomannosemutase
- 5 = UDP-Glucose-Pyrophosphorylase
- 6 = GDP-Mannose-Pyrophosphorylase
- 7 = Hexokinase

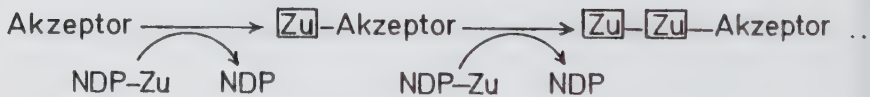
Die nukleotidgebundenen Zucker können durch verschiedene Umsetzungen verändert werden, z.B. durch Oxydation, Decarboxylierung, Reduktion oder Epimerisierung (Ginsburg, 1964).

Alle bekannten natürlich vorkommenden Nukleotidzucker haben am C1 entweder α -D oder β -L Konfiguration. Die Übertragung des Glycosylrestes vom NDP-Rest auf einen Akzeptor geschieht unter Inversion der anomeren Bindung. Es gibt in Polysacchariden jedoch α - und β -gebundene D-Zucker. Die Bildung einer α -Bindung wird in diesem Falle durch doppelte Inversion oder durch die Beteiligung einer Zwischenstufe erklärt.

Die Verlängerung der Zuckerkette kann nach verschiedenen Mechanismen erfolgen. Der Akzeptor kann schrittweise durch

Obertragung von aktivierten Monosacchariden auf das nicht-reduzierende Ende verlängert werden (Abb. 7). Nach diesem Prinzip werden meist Homopolysaccharide (z.B. Stärke) oder Heteropolysaccharide, die nicht aus Wiederholungseinheiten bestehen, gebildet.

Abb. 7:



Viele bakterielle Heteropolysaccharide bestehen jedoch aus oligosaccharidischen Struktureinheiten (repeating units). Die Synthese dieser Polysaccharide verläuft im allgemeinen so, daß an einem Carrier-Lipoid Oligosaccharide zunächst gebildet und dann ebenfalls an diesem Carrier polymerisiert werden. Durch die Bindung an das Carrier-Lipoid werden die hydrophilen Zuckereinheiten leichter in die hydrophobe Umgebung in der zytoplasmatischen Membran eingebracht, in der die Biosynthese stattfindet.

Das Carrier-Lipoid wurde gleichzeitig von Strominger und Mitarbeitern (Anderson et al., 1965) bei der Untersuchung der Mureinbiosynthese und von Robbins und Mitarbeitern (1965a) bei der Untersuchung der O-Antigen-Biosynthese isoliert und als ein Polyprenol identifiziert. Seine Struktur ist in Abb.7a wiedergegeben.

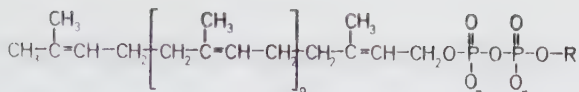


Abb. 7a: Polyprenolphosphat (auch Bactoprenolphosphat, Antigen-Carrier-Lipid ACL, Glycosyl-Carrier-Lipid GCL). R stellt einen Mono- oder Oligosaccharid-Rest dar. Nach Higashi et al., 1967 und Wright et al., 1967.

Bactoprenolbeteiligung wurde bei der Synthese von vielen bakteriellen Zellwandpolysacchariden gefunden (Hemming, 1974; Lennarz und Scher, 1972). Auch bei der Ubetragung von Monosacchariden wie bei der Mannansynthese in Micrococcus luteus (Scher et al., 1968) ließ sich eine Bactoprenolzwischenstufe nachweisen.

Neben Polyprenolphosphat, das als Lipoidcarrier in Bakterien vorkommt, gibt es noch andere Lipoide, die bei Polysaccharidbiosynthesen bei höheren Organismen beteiligt sind. Dolichol, ein Gemisch aus Polyprenolen mit 15-20 Isopreneinheiten, wurde bei der Mannansynthese in Saccharomyces cerevisiae (Tanner et al., 1971) und bei der Glycoproteinbiosynthese in Pflanzen und Tieren gefunden (Alam et al., 1971; Richards et al., 1971; Behrens et al., 1971). Bei der Biosynthese eines Glycoproteins in der Leber wurde die Beteiligung von Retinol gefunden (De Luca, 1970), das auch bei der Synthese von Mucopolysacchariden (Wassermann und Corradine, 1971) eine Rolle spielt.

1.6 Biosynthese der Lipopolysaccharide

Bei der Biosynthese der Lipopolysaccharide erfolgt die Bildung der drei Bereiche unabhängig voneinander. Durch die Übertragung des O-spezifischen Polysaccharids auf den Core-Lipoid A-Komplex wird dann die Synthese beendet.

1.6.1 Biosynthese des Lipoid A

Über die Synthese des Lipoid A-Teils ist noch wenig bekannt, da lange Zeit keine geeigneten Defekt-Mutanten zur Verfügung standen. Osborn und Mitarbeiter (1974) konnten thermosensitive Mutanten von S.typhimurium isolieren, welche bei erhöhter Temperatur die KDO-Lipoid A-Region unvollständig synthetisieren. Bei einer dieser temperatursensitiven Mutanten lag der Defekt in der KDO-Biosynthese, eine andere war in einem früheren Schritt der Lipoid A-Biosynthese, beim Einbau der Fettsäuren, blockiert. Defekte in der Lipoid A-Biosynthese verursachen eine Hemmung des Bakterienwachstums.

1.6.2 Biosynthese des Kernoligosaccharids

Die Bildung des Core-Oligosaccharids verläuft an einem Lipoid-Akzeptor, vermutlich dem Lipoid A. Dabei wird das Oligosaccharid schrittweise verlängert. Spezifische Glycosyltransferasen übertragen die einzelnen Zucker von ihren Nucleotidzucker-Vorstufen direkt und nacheinander auf das Akzeptormolekül (Osborn und Rothfield, 1971). Edstrom und Heath (1967) zeigten, daß die Core-Oligosaccharide bei E. coli nach dem gleichen Mechanismus wie bei Salmonella gebildet werden.

Abbildung 8 gibt einen schematischen Überblick über den Ablauf der Core-Biosynthese.

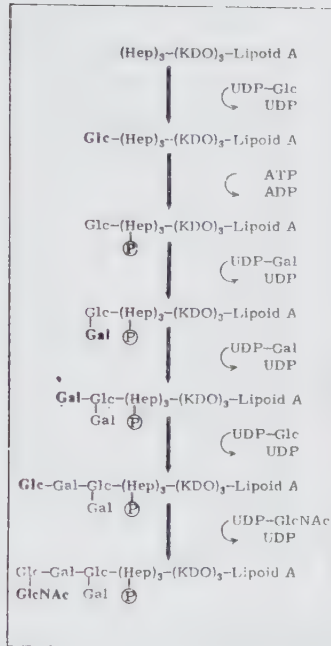


Abb. 8: Biosynthese des Core von *S. typhimurium*
(Osborn und Rothfield, 1971)

Bei der *in vitro*-Biosynthese des Core-Oligosaccharids kann das Lipoid A nur in Gegenwart von Phospholipiden als Akzeptor wirken (Rothfield und Romeo, 1971). Die Autoren nehmen an, daß die Transferaseenzyme spezifisch an einen Komplex aus inkomplettem Lipopolysaccharid und Phospholipiden an der Membran binden.

1.6.3 Biosynthese der O-spezifischen Polysaccharide

Die Bildung des O-spezifischen Polysaccharids ist bei Salmonella besonders gut untersucht (Robbins und Wright, 1971; Nikaido, 1973). Bei der Synthese ist Bactoprenol beteiligt. Die Biosynthese des O-spezifischen Polysaccharids von S. typhimurium sei als Beispiel näher erläutert. Abb. 9 zeigt, wie aus den aktivierten Zuckerbausteinen am Antigen-Carrier-Lipid die Wiederholungseinheit zusammengesetzt wird.

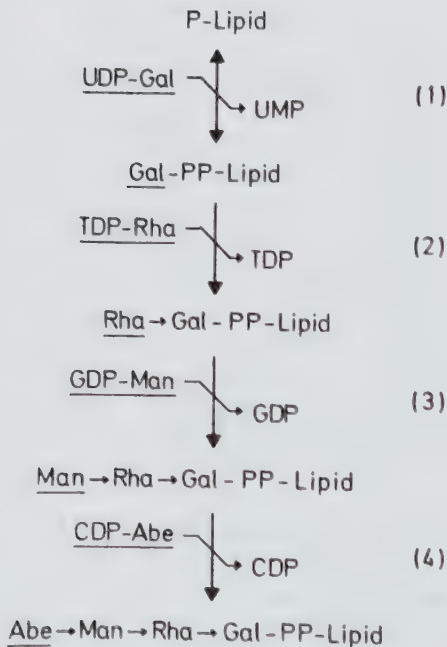


Abb. 9: (Osborn, 1971) Biosynthese einer Wiederholungseinheit von S. typhimurium; (1)-(4): Funktion der entsprechenden Glycosyltransferasen

Bei der Polymerisation der Wiederholungseinheiten und bei der Übertragung des fertigen Polysaccharids auf den Akzeptor wird das Carrier-Lipoid wieder freigesetzt. Die Kette war durch eine Pyrophosphat-Bindung daran gebunden, und nach der Freisetzung muß der Carrier dephosphoryliert werden, bevor an ihm die Synthese eines neuen Polysaccharids wieder beginnen kann. Diese Reaktion kann durch Bacitracin gehemmt werden (Siewert und Strominger, 1967).

Bei ihrer Biosynthese wächst die Polysaccharidkette vom reduzierenden Ende her, wie das in Abb. 10 schematisch dargestellt ist. Dies wurde an S. anatum von Bray und Robbins (1967) untersucht und gilt auch für S. typhimurium.

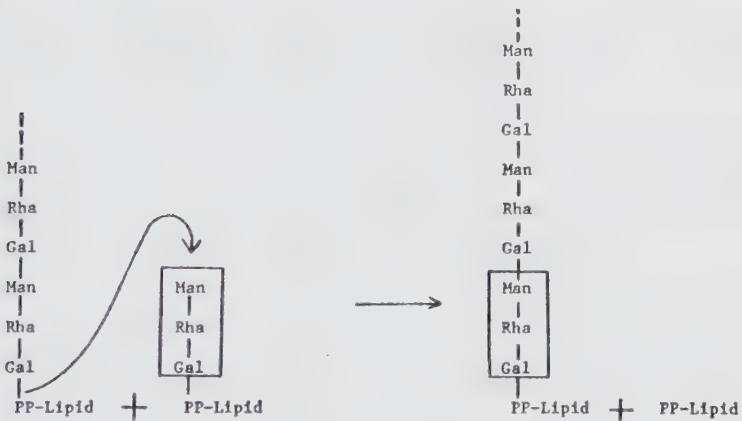
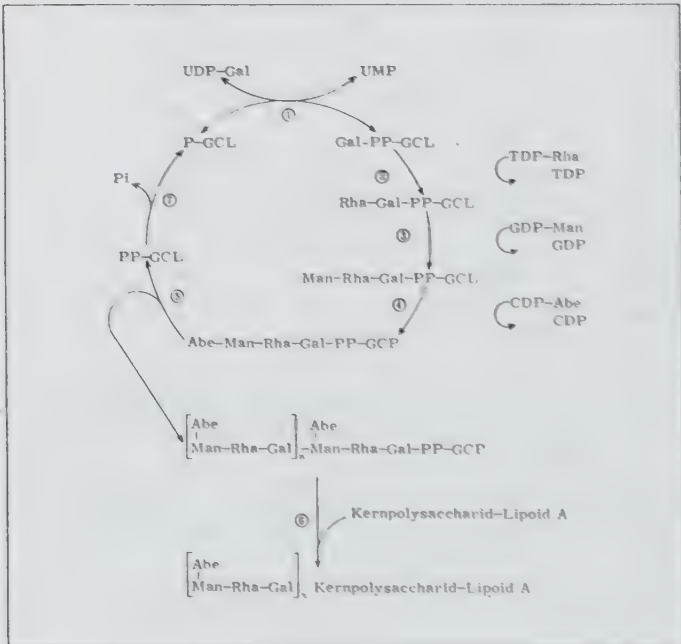


Abb. 10: Wachstum des O-spezifischen Polysaccharids von S. anatum am reduzierenden Ende (Bray und Robbins, 1967).

Die Polymerisation der Wiederholungseinheiten ist begrenzt, so daß im allgemeinen Polysaccharidketten mit ca. 10 - 15 Wiederholungseinheiten entstehen. Es sind aber auch Lipopolysaccharide beschrieben worden (Jann et al., 1975), die Mischpopulationen verschiedener Kettenlängen darstellen. Dabei treten Mehrfache einer Polysaccharidgrundkette mit ca. 10 Wiederholungseinheiten auf.

Wie die Kontrolle der Kettenlänge erfolgt, ist bisher nicht bekannt. Möglicherweise steht die Polymerase unter der Kontrolle des Enzyms, welches das Polysaccharid vom Carrier-Lipoid auf den Core-Lipoid A-Teil überträgt (Translocase oder Ligase).

Abb. 11 Schematische Darstellung des Ablaufs der Biosynthese des LPS von *S. typhimurium* (nach Osborn, 1971) GCL= Glycosyl carrier lipid



Das am Beispiel des O-spezifischen Polysaccharids von S. typhimurium beschriebene Biosynthesystem wurde vielfach als allgemeingültig angesehen. Bei der Synthese bakterieller Zellwandpolysaccharide einiger anderer Organismen wurden jedoch auch abweichende Ergebnisse gefunden. So sind zu übertragende Monosaccharide im Gegensatz zum Oligosaccharidtransfer über eine Phosphodiesterbrücke gebunden, wie z.B. bei M. luteus (Scher et al., 1968) und nicht über Pyrophosphat. Bei der Biosynthese des O-Antigens in S. montevideo (Gmeiner und Nikaido, unveröffentl.), des Ribitol-Phosphats in Staph. aureus (Fiedler und Glaser, 1974) eines Heteropolysaccharids in M. luteus (Page und Anderson, 1972) und des Mannans in Saccharomyces carlsbergensis (Behrens und Cabib, 1968) konnte keine Beteiligung eines Polyprenolphosphats nachgewiesen werden.

1.7 Genetik bakterieller Lipopolysaccharide

Die Isolierung von Bakterienmutanten und Rekombinanten mit unvollständig aufgebaute O-Antigen ist sehr hilfreich für die Erforschung der Biosynthese des Lipopolysaccharids und für Untersuchungen zur Struktur und Virulenz.

An S. typhimurium wurde untersucht, welche verschiedenen Gene, bzw. Gen-Gruppen, auf dem Bakterienchromosom die Enzyme für die Lipopolysaccharid Biosynthese codieren (Mäkelä und Stocker, 1969; Stocker und Mäkelä, 1971). Eine allgemeine Genkartierung bei S. typhimurium wurde von Sanderson (1972) beschrieben. Im wesentlichen sind drei getrennte Genbereiche für die Synthese verantwortlich.

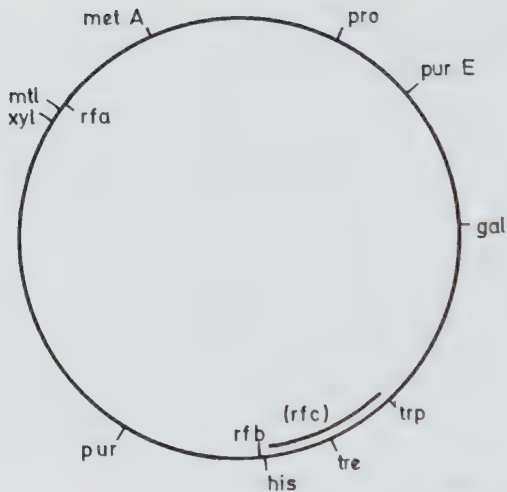


Abb. 12: Genorte für die Lipopolysaccharid-Biosynthese auf dem Chromosom von S. typhimurium.

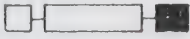
Der rfa-locus (beim xyl-Genort, der die Umsetzung von Xylose codiert) determiniert die Bildung des Core-Oligosaccharids. Der rfb-locus (beim his-Genort, der die Synthese von Histidin determiniert) bestimmt die Synthese der einzelnen oligosaccharidischen Wiederholungseinheiten. Der rfc-locus codiert die Polymerisation der Oligosaccharide.

Deletion dieser Genorte führt zu verschiedenen Auswirkungen auf die Lipopolysaccharid-Biosynthese. Mutation des rfa-Genortes bewirkt eine inkomplette Ausbildung des Kernoligosaccharids. Da der Akzeptor für das O-spezifische Polysaccharid nicht gebildet wird, entstehen R-Mutanten, die das O-spezifische Polysaccharid synthetisieren.

Bei Mutation des rfb-Genortes entstehen ebenfalls R-Mutanten, die komplettes R-Lipopolysaccharid aber kein O-spezifisches Polysaccharid bilden.

Eine Sonderstellung nehmen die Mutanten *rfaL* und *rfaT* ein, die spezifische Translocasen für die Übertragung des O-spezifischen Polysaccharids auf den Core nicht bilden können. Beide synthetisieren sowohl Core als auch O-spezifisches Polysaccharid vollständig.

Bei defektem *rfc*-Genort können die für das O-spezifische Polysaccharid gebildeten Wiederholungseinheiten nicht polymerisiert werden. Nur eine einzige Wiederholungseinheit wird auf Core-Lipoid A übertragen, d.h. es wird SR-Lipopolysaccharid gebildet. Tabelle 5 zeigt die Produkte von Mutationen dieser Genorte.

Phänotyp	Mutation	betroffene Enzyme	LPS Strukturschema
S	-	-	
SR	<i>rfc</i>	Oligosaccharid-Polymerase	
R	<i>rfa</i>	O-spez. Glycosyltransferasen, Nucleotidzucker-Synthetasen	
R	<i>rfa</i>	Core-spezifische Glycosyltransferasen	

Tab. 5 Auswirkung verschiedener Mutationen auf Synthese und Struktur enterobakterieller Lipopolysaccharide

1.8 Genetik und Biosynthese der O-Antigene 8 und 9 von E. coli

1.8.1 Genetik

Die Biosynthese der 08 und 09 Antigene von E. coli ist ähnlich determiniert, wie die der O-Antigene von S. typhimurium (Schmidt et al., 1970; Taylor und Trotter, 1972). Es werden auch an einem rfa-Genort Core-spezifische und an einem rfb-Genort O-spezifische Glycosyltransferasen codiert. Bei E. coli 08 und 09 wurde jedoch im Gegensatz zu S. typhimurium kein rfc-locus gefunden, der die Polymerisation von Oligosacchariden codiert. Zu der Bildung des Lipopolysaccharids wird hier der rfe-Genort benötigt, der auch die Synthese des Common Antigen determiniert (Schmidt et al., 1976). Welches Enzym für die Polysaccharidbiosynthese am rfe-locus codiert wird, ist noch nicht bekannt. Bei S. montevideo (Serogruppe C₁) und S. minnesota (Serogruppe L) ist ebenfalls der rfe-Genort an der O-Antigen-Biosynthese beteiligt (Mäkelä et al., 1970).

1.8.2 Biosynthese

Die O-Antigene 8 und 9 von E. coli werden nach einem Biosynthesemechanismus gebildet, der von dem bisher (s. Kap. 1.6.3) für O-spezifische Polysaccharide beschriebenen (Nikaido, 1968; Nikaido, 1973; Robbins und Wright, 1971) abweicht. Die Ergebnisse von Kopmann (1974), Kopmann und Jann (1975), Flemming (1976) und Flemming und Jann (1978) lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Die 08 und 09-Mannane werden ohne die Beteiligung von an Polyprenol-Phosphat gebundenen Oligosacchariden gebildet. Im Gegensatz zur O-Polysaccharid-Biosynthese bei S. typhimurium wird hier die Synthese nicht durch Bacitracin gehemmt und zwei-

wertige Ionen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} sind nicht essentiell. Die Polysaccharidkette wächst am nicht-reduzierenden Ende. Während des Wachstums ist sie an einen hydrophoben Carrier gebunden, der in der Membran verankert ist. Ein Zwischenprodukt konnte in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nachgewiesen werden, war jedoch nicht mit organischen Lösungsmitteln extrahierbar. In der Bindungsregion zwischen Carrier und Polysaccharidkette wurde ein Phosphoester gefunden. Aus der leichten Abspaltbarkeit des Mannans vom Trägermolekül mit $HgCl_2$ wurde auf das Vorhandensein von Schwefel in der Bindungsregion geschlossen. Eine weitere Interpretation des Befundes wäre die Anwesenheit einer Vinyläthergruppierung, wie bei Plasmalogenen (Norton, 1959). Das reduzierende Ende des vom Carrier freigesetzten Polysaccharids ist Glucose.

Auffallend ist, daß neben den O-Antigenen 8 und 9 von E. coli auch die O-Antigene 3 und 5 von Klebsiella, die ebenfalls Homopolysaccharide (Mannane) sind, nach einem abweichenden Biosynthesemechanismus gebildet werden. Auch das T1-Antigen von Salmonella, welches ein neutrales Homopolysaccharid aus Galactose oder Ribose ist (Wheat et al., 1967), wird nicht nach dem in Kap. 1.6.3 beschriebenen Mechanismus synthetisiert (Sarvas et al., 1971).

2. Problemstellung und Ziel der Arbeit

Folgende Aspekte waren Ausgangspunkt unserer Untersuchungen:

- 1.) Das unter Abspaltung von der Membran isolierte Produkt der in vitro-Synthese des 09-Antigens zeigte keine Antigenspezifität (Kopmann, 1974). Dies führte zu der Frage, ob die serologische Spezifität bei der Isolierung verlorengegangen war, oder ob im in vitro-Synthese-System kein serologisch spezifisches Polysaccharid gebildet wird, z.B. dadurch, daß eine immundominante Gruppe, die analytisch nicht erfaßt wurde, nicht auf das Polysaccharid übertragen wird.
- 2.) Die Natur des in der Membran verankerten Carriers, an dem das Mannan gebildet wird, ist bisher unbekannt. Mit organischen Lösungsmitteln konnte er nicht extrahiert werden (Kopmann und Jann, 1975). Nach den vorliegenden Ergebnissen könnte es sich bei dem Trägermolekül um ein Lipoid handeln, das fest an Membranproteine assoziiert ist. Es wäre aber auch denkbar, daß das Trägermolekül ein Peptid ist, obwohl ein Peptid-Carrier bisher bei keiner Polysaccharidbiosynthese beschrieben wurde. Die weiteren Untersuchungen sollten zur Isolierung, Reinigung und Charakterisierung des Trägermoleküls beitragen.
- 3.) Während der hier beschriebenen Untersuchungen wurde am reduzierenden Ende des 09-Mannans Glucose gefunden (Flemming und Jann, 1978). Daraus ergibt sich, daß zuerst Glucose auf das Trägermolekül übertragen werden muß und erst dann die Übertragung der Mannosen folgt. Um ein genaues Verständnis des Biosyntheseablaufs zu erhalten, mußte untersucht werden, wie die Übertragung der Glucose und die Übertragung von Mannose auf den Carrier stattfindet.

UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE

3. Untersuchungen zur serologischen Spezifität des 08 und 09-Antigens

Die Antigene der 08 und 09-Gruppe von E. coli sind Lipopolysaccharide, deren O-spezifische Polysaccharide (s. Kap. 1.2.2) Mannane sind. Ihre Wiederholungseinheiten sind in Tabelle 4 Kap. 1.4.2 aufgeführt.

Obwohl die Wiederholungseinheit des 08-Mannans in der des 09-Mannans enthalten ist, zeigen beide Antigene keine serologische Kreuzreaktion. Dies bedeutet, daß immundeterminante Strukturen, die am 08-Antigen von spezifischen Antikörpern erkannt werden, von den gleichen Antikörpern am 09-Antigen trotz weitgehend identischer Primärstruktur nicht erkannt werden.

Jann und Jann (persönliche Mitteilung) fanden, daß die serologische Aktivität dieser Antigene verloren geht, wenn durch milde saure Hydrolyse das O-Polysaccharid von dem Lipoid A-Teil abgespalten wird. Normalerweise bleibt die serologische Aktivität O-spezifischer Polysaccharide bei dieser Reaktion erhalten.

In Untersuchungen zur Biosynthese des 09-Mannans wurde das von E. coli in vivo gebildete Produkt (komplettes Lipopolysaccharid) mit Hilfe des Antigenbindungstests als 09-Mannan identifiziert (Kopmann, 1974). Das Produkt der in vitro Synthese (Polysaccharidkomponente des Lipopolysaccharids, Mannan) konnte jedoch nach Abtrennung von der zytoplasmatischen Membran durch Phenol-Wasser-Extraktion (Westphal et al., 1952) keine Antikörper mehr binden (Kopmann, 1974).

Diese Ergebnisse kann man auf zwei Arten erklären:

Während der Abspaltung des Mannans (Degradierung) mit milder Säure wird gleichzeitig eine immundominante Gruppe von dem Polysaccharid abgespalten. Dadurch geht die serologische Aktivität verloren. Bei der in vitro Synthese des O-Antigens ist diese Gruppe nicht übertragen worden.

Für die serologische Aktivität ist eine räumliche Orientierung des Polysaccharids verantwortlich, die durch die Bindung an die Membran, bzw. an Lipoid A, in bestimmter Weise festgelegt wird. Die Freisetzung des Mannans verändert dann die spezifische räumliche Orientierung und damit geht die serologische Aktivität verloren.

3.1 Serologische Identifizierung des in vitro gebildeten Mannans

Kopmann (1974) und Flemming (1976) konnten zeigen, daß Membranpräparationen (Osborn et al., 1972) und mit EDTA behandelte Zellen (Robbins et al., 1964) von E. coli 09 F 860 und 08 F 945 nach Inkubation mit GDP-Mannose ein Mannan synthetisieren. Dieses Mannan bleibt an die Membran gebunden.

Durch Extraktion von Membranen oder beschallten, mit EDTA behandelten Zellen mit 0,1 % Triton X 100 (TX 100) haben wir eine Mannan-Carrier-Verbindung solubilisiert. Das wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese des Extraktes gezeigt. Der TX 100-Extrakt wurde in einem Amicon-Ultrafiltrationsgerät konzentriert. Das TX 100 wurde durch Zusatz von Äthylenglycol und Äthanol zur Auflösung der Detergens-Micellen nach Frasch (1976) entfernt.

Diese Antigenpräparation, die das ^{14}C -markierte, an den Carrier gebundene Produkt enthielt, untersuchten wir im Antigenbindungstest (Rüde et al., 1971). Wir verwendeten anti-08 und anti-09 Antiseren von Kaninchen und Kaninchen-Normalserum. Die gebildeten Antigen-Antikörperkomplexe wurden mit Anti-Kaninchen-Gamma-Immunglobulin-Serum aus Ziegen präzipitiert.

Zum Vergleich verwendeten wir das Produkt der in vitro Synthese, welches mit 45 % wässrigem Phenol bei 65°C extrahiert und über Sephadex G 200 gereinigt worden war. Es wurde unmittelbar nach dem Ausschlufvolumen eluiert und wanderte bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nicht in das Gel ein. Diese Präparation enthielt also das vom Carrier abgespaltene Mannan. Das Ergebnis ist in Tab. 6 zusammengefaßt:

<u>in vitro</u> Produkt	% cpm präzipitiert mit		
	anti 08	anti 09	Normalserum
08-TX 100	18.5	1.5	1.5
08-PW	1.5	0.8	1.5
09-TX 100	0.5	20.5	1.0
09-PW	1.0	2.0	1.7

Tab. 6: Antigenbindungstest mit in vitro gebildetem 08 und 09 Polysaccharid. TX 100 = an den Carrier gebundenes-, PW = vom Carrier abgespaltenes Mannan. Die Antiseren waren 1 : 2 verdünnt. Für jeden Test wurden etwa 8000 cpm eingesetzt. Die im Präzipitat gefundene Radioaktivität wurde als Prozentanteil der gesamten Radioaktivität gemessen.

Wie in Tab. 6 gezeigt, reagiert das freie Polysaccharid nicht mit anti-08 oder anti-09 Antikörpern. Das an den Carrier gebundene Polysaccharid zeigt jedoch eine spezifische Bindung an die homologen Antikörper.

Die Präzipitationskurve für das 09-Antigen, die durch verschiedene Antigen/Antikörper-Verhältnisse erhalten wurde, ist in Abb. 13 gezeigt.

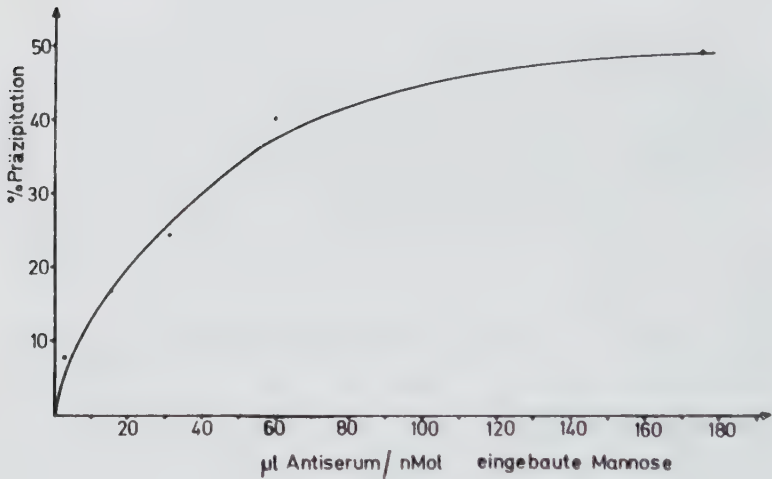


Abb. 13: Präzipitationskurve des in vitro gebildeten 09-Mannans mit 09-Antikörpern.

Diese Ergebnisse zeigen, daß in vitro das serologisch aktive O-spezifische Polysaccharid gebildet wird und somit das in vitro synthetisierte Produkt die Vorstufe des 08- bzw. 09-Antigens von E. coli darstellt. Wenn das Polysaccharid nach in vitro Synthese mit 45 %igem Phenol, unter Abspaltung vom Carriermolekül, extrahiert wird, ist es jedoch nicht serologisch aktiv.

3. 2 Auswirkung der Bindung des Polysaccharids an den Carrier auf die serologische Aktivität

In Kapitel 3.1 wurde gezeigt, daß das Polysaccharid serologisch aktiv ist, wenn es an den Carrier gebunden ist, während das vom Carrier isolierte Polysaccharid serologisch nicht aktiv ist. Die Überlegung lag nahe, daß für die serologische Aktivität die Bindung des Polysaccharids an den Carrier maßgeblich ist. Dies wurde durch folgendes Experiment geprüft:

Eine Probe des TX 100-Extrakts, der an den Carrier gebundenes Polysaccharid enthält (s. 3.1) wurde in 0.01 N Schwefelsäure 30 Minuten bei 100°C inkubiert. Nach Neutralisation mit Natronlauge wurde ultrazentrifugiert und der Überstand wurde dann nach Reinigung über Sephadex G 200 wie in 3.1 zum Antigenbindungstest eingesetzt. Tab. 7 faßt das Ergebnis zusammen:

in vitro Produkt	% cpm präzipitiert mit	
	anti-09 Serum	Normalserum
09 TX100-Extr.	18.8	2.7
09 TX100-Extr. nach Säurespaltung	3.6	2.9

Tab. 7: Antigenbindungstest mit in vitro gebildetem Produkt vor und nach Säurespaltung

Das Ergebnis des Antigenbindungstests zeigt, daß nur das an den Carrier gebundene Polysaccharid serologisch aktiv ist, und daß diese Aktivität durch Spaltung der Bindung verloren geht. Dies spricht für die Annahme, daß für die serologische Aktivität die Überstruktur des Polysaccharids verantwortlich sein könnte. Durch Abspaltung des Polysaccharids wird sie dann so verändert, daß es serologisch nicht mehr aktiv ist. Das wird durch folgende Untersuchungen am 08- und 09 Antigen

von Jann und Mitarbeitern (1978) bestärkt:

Im Hämagglutinationstest wird die Agglutination im homologen System durch Antigenzugabe (Lipopolysaccharid) gehemmt. Vom Lipoid A abgetrenntes Polysaccharid inhibiert nicht, jedoch Polysaccharid, welches mit Stearinsäure substituiert ist und somit, ähnlich wie im Lipopolysaccharid, wieder an einen lipophilen Rest gebunden vorliegt, kann die Agglutination hemmen. Das heißt, daß beim Polysaccharid der Verlust der Antigeneigenschaften durch Bindung an Stearinsäure wieder rückgängig gemacht werden kann.

3.3 Zusammenfassung von Kapitel 3

Im Antigenbindungstest konnte gezeigt werden, daß das in vitro gebildete Mannan von E. coli 08 und 09 die entsprechende Antigenspezifität besitzt. Damit ist gezeigt, daß in vitro alle Reaktionsschritte ablaufen, die zum serologisch aktiven, O-spezifischen Mannan führen.

Die Antigenspezifität geht jedoch verloren, sobald das Polysaccharid vom Carriermolekül abgespalten wird. Diese Ergebnisse stimmen überein mit früheren Untersuchungen an in vivo gebildetem Produkt. Die serologische Aktivität des (Lipo)-Polysaccharids geht, wie in Versuchen von Jann und Jann gezeigt wurde, verloren, wenn das O-spezifische Polysaccharid von Lipoid A abgespalten wird. Durch Stearoylisierung des Polysaccharids kann sie wieder hergestellt werden.

Daraus schließen wir, daß für die serologische Spezifität des 09-Antigens von E. coli eine Oberstruktur der Polysaccharidkette verantwortlich ist und die Immundeterminanten nicht nur in der Sequenz der Zucker enthalten sind. Die Oberstruktur des Polysaccharids geht bei Abspaltung von einem

Carrier-molekül oder von Lipoid A vermutlich verloren. Das Mannan wird dann nicht mehr von den entsprechenden Antikörpern erkannt.

Dabei kann es sich um eine Konformationsänderung der Polysaccharidkette handeln. Es kann aber auch sein, daß die Mannanketten gebündelt (z.B. in Form von Micellen) vorliegen und so serologisch aktiv sind. Nach Freisetzung können sie eine für den Antikörper wichtige Anordnung relativ zueinander verlieren. Die letztere Möglichkeit wurde als "Membraneffekt" bei veränderten Phagenrezeptoreigenschaften freier und gebundener O8-Mannane diskutiert (Prehm und Jann, 1976).

4. Zur Natur des Carriermoleküls

Die Biosynthese O-antigener Polysaccharide findet an der zytoplasmatischen Membran statt. Dabei läuft die Polymerisation an einem Carriermolekül ab, das seinerseits ein integraler Bestandteil der Membran ist (Nikaido, 1973; Robbins und Wright, 1971; Hemming, 1974). Dieses Trägermolekül ist bei der Synthese vieler Polysaccharide als Polyisoprenphosphat oder Polyisoprenpyrophosphat beschrieben worden (Hemming, 1974; Lennarz und Scher, 1972). Die aus Bakterien erhaltenen Polyisoprenphosphate werden als Baktoprenolphosphate bezeichnet. In allen Fällen konnten Lipoid-gebundene Mono- bzw. Oligosaccharide mit organischen Lösungsmitteln wie Butanol oder Chloroform-Methanol extrahiert werden.

Bei der Biosynthese des O-Antigens von E. coli 09 (Kopmann und Jann, 1975) und der verwandten O-Antigene von E. coli 08 sowie Klebsiella 03 und 05 (Flemming, 1976) konnte bisher kein mit organischen Lösungsmitteln extrahierbares, mit radioaktiven Zuckern beladenes Lipoid-Zwischenprodukt isoliert werden.

Da alle erwähnten O-Antigene Mannane sind, kann man annehmen, daß die Mannansynthese in den beschriebenen Fällen nicht über die intermediäre Bildung von an Bactoprenol gebundener Mannose oder Mannose-Oligosacchariden abläuft. Das Carriermolekül für die wachsende Polysaccharid-Kette könnte eines der Lipide sein, die fest an Membran-Proteine assoziiert sind, wie das bei allen neueren Membran-Modellen, z.B. dem Fluid Mosaic Modell (Singer und Nicolson, 1972), diskutiert wird. Es ist aber auch möglich, daß dieses Carriermolekül ein Peptid ist, obwohl ein Peptid-Carrier bislang bei keiner Polysaccharid-Biosynthese beschrieben wurde. In beiden Fällen kann man nicht erwarten, mit organischen Lösungsmitteln ein Zwischenprodukt zu isolieren.

Es ist bislang noch nicht geglückt, das Carriermolekül in vivo radioaktiv zu markieren und dann direkt zu untersuchen. Im folgenden werden Versuche beschrieben, den Carrier-Mannan-Komplex zu isolieren und zu reinigen. Dies soll zu einer Untersuchung des Trägermoleküls beitragen.

4.1 Isolierung des an den Carrier gebundenen (^{14}C) Mannans nach in vitro-Synthese

Bei der in vitro Synthese bleibt das O9-Mannan an das Carriermolekül gebunden und wird nicht auf Core-Lipoid A übertragen. Isolierung und Reinigung des mit (^{14}C) Mannose markierten Produktes erfassen daher auch das Carriermolekül.

4.1.1 Solubilisierung mit Triton X 100

Während periphere Membranproteine durch Änderung der Ionenkonzentration des Milieus von Membranen abgelöst werden können, lassen sich integrale Membrankomponenten sehr häufig mit Detergentien aus der Membran herauslösen (s. auch Kap. 8). Dabei

bilden sich im allgemeinen Misch-Micellen mit dem Detergens (Helenius und Simons, 1975).

Für unsere Solubilisierungsversuche verwendeten wir Membranpräparationen aus *E. coli* F 860, die mit GDP (^{14}C) Mannose inkubiert und dann durch Ultrazentrifugation in Puffer gereinigt wurden. Diese Präparate enthielten nur an die Membran gebundene Radioaktivität. Je 50 μl der markierten Membranen wurden mit 4 ml Wasser, 4 M NaCl oder 0.1 % Triton X 100 (TX 100) 30 Minuten lang bei 20°C extrahiert. Als Kontrolle wurde eine Probe unter gleichen Bedingungen mit 0.1 M Tris-Puffer inkubiert. Nach anschließender einstündiger Zentrifugation bei 100 000 g wurde das Sediment in Puffer aufgenommen und nochmals zentrifugiert. Es wurde dann in Puffer resuspendiert und mit einem Aliquot die in ihm enthaltene Radioaktivität gemessen. Mit der Hauptmenge des Sediments wurde die Extraktion mit TX 100 wiederholt. Der Überstand der ersten Ultrazentrifugation wurde in einer Amicon-Ultrafiltrationskammer mit einer UM2-Membran (Durchlässigkeitsgrenze etwa 1500 Dalton) eingeeengt und dann für Protein-Bestimmung und Messung der Radioaktivität verwendet. Die Ergebnisse (Tab. 8) zeigen, daß weder bei niedriger noch bei hoher Ionenkonzentration das radioaktive Produkt von der Membran abgelöst wird. Hingegen ist fast die gesamte Radioaktivität mit TX 100 solubilisierbar.

Extraktionsmittel	% cpm Oberst.	% Protein gelöst
Wasser	11,9	8,9
4 M NaCl	8,3	6,7
0,1 % TX 100 (1. 30 Min.)	80,7	47,8
0,1 % TX 100 (2. 30 Min.)	12,2	12,7
0,1 M Tris	8,7	5,6

Tab. 8: Extraktion des an den Träger gebundene ^{14}C -Mannans aus Membranpräparationen mit Wasser, 4 M NaCl und 0.1 % TX 100. Die solubilisierete Radioaktivität wurde als Prozentanteil der gesamten Radioaktivität gemessen. Für einen Extraktionsversuch wurden etwa 50 000 cpm eingesetzt.

Dabei werden nur etwa 60 % der Membranproteine abgelöst. Dies bedeutet eine erste Anreicherung des radioaktiven Materials im TX 100-Extrakt. Es sollte untersucht werden, ob das radioaktive Material, das aus der Membran mit TX 100 extrahiert wurde, Eigenschaften der Carrier-Mannan-Verbindung hat. Es ist schon früher gezeigt worden, daß diese Verbindung bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ein typisches Wanderungsverhalten zeigt (Kopmann und Jann, 1975). Wir haben deshalb das mit TX 100 aus der Membran erhaltene radioaktive Produkt in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit dem radioaktiven Material verglichen, das nach in vitro Synthese direkt durch Solubilisieren der Membran mit SDS erhalten wurde. Wie Abb. 14 zeigt, verhalten sich beide Präparate gleich.

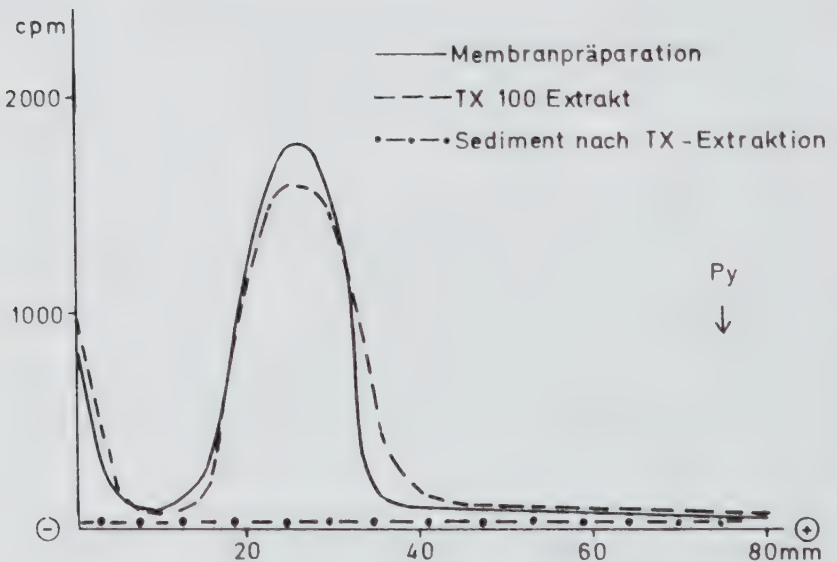


Abb. 14: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von ^{14}C -markierten a) Membranpräparationen und von b) Sediment und c) Überstand der TX 100-Extraktion aus diesen Membranpräparationen.

Zur Klärung der Frage, ob mit TX 100 die Membran selektiv solubilisiert wird, wurde die Extraktion mit der durch Gradientenzentrifugation isolierten radioaktiven zytoplasmatischen Membran wiederholt. Dabei wurde das radioaktive Produkt ebenfalls völlig solubilisiert. Die Membran wurde vor und nach der Extraktion in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht. Die mit Coomassie Blue angefärbten Gele sind in Abb. 15 dargestellt.

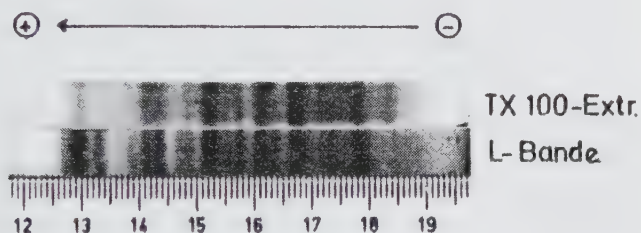


Abb. 15: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von L-Bande und TX 100-Extrakt von L-Bande. Die Proteine wurden mit Coomassie Blue angefärbt.

Die Proteinmuster beider Gele sind identisch. Die zytoplasmatische Membran wird demnach durch TX 100 unter den angewandten Bedingungen partiell, aber nicht selektiv solubilisiert. Es sei erwähnt, daß diese Aussage nur für die hier untersuchten physikalischen Eigenschaften, nicht aber für biologische Funktionen der Proteine gilt. Außerdem kann man sagen, daß die Membranregionen, in denen sich das Carriermolekül befindet, leichter solubilisierbar sind.

Durch Extraktion mit Triton X 100 werden im allgemeinen kleine Vesikel erhalten (Helenius und Simons, 1975). Diese sollten weiter desintegriert werden und die Carrier-Mannan-Verbindung sollte dann durch Gelchromatographie von Protein abgetrennt werden. Dazu wurde zunächst TX 100 durch Ultrafiltration ent-

fernt. Der Zusatz von Äthanol (10 % Endkonzentration) und Äthylenglykol (30 % Endkonzentration) bewirkte die Auflösung von Detergens-Micellen (Frasch, 1976). Das Produkt wurde nach der Ultrafiltration in 4 M Harnstoff aufgenommen und in Gegenwart von 4 M Harnstoff an Biogel A5m chromatographiert. Es zeigte sich (Abb. 16), daß ein großer Teil des Proteins abgetrennt werden konnte. Das radioaktive Material erschien jedoch, zusammen mit Protein, im Ausschlußvolumen der Säule. Das entspricht einem apparenten Molekulargewicht über 5×10^6 D (abgeschätzt aus den Geltrennbereichsangaben von Bio-Rad). Die gleichen Ergebnisse wurden bei Chromatographie in Gegenwart von 8 M Harnstoff oder 4 M Guanidin-HCl

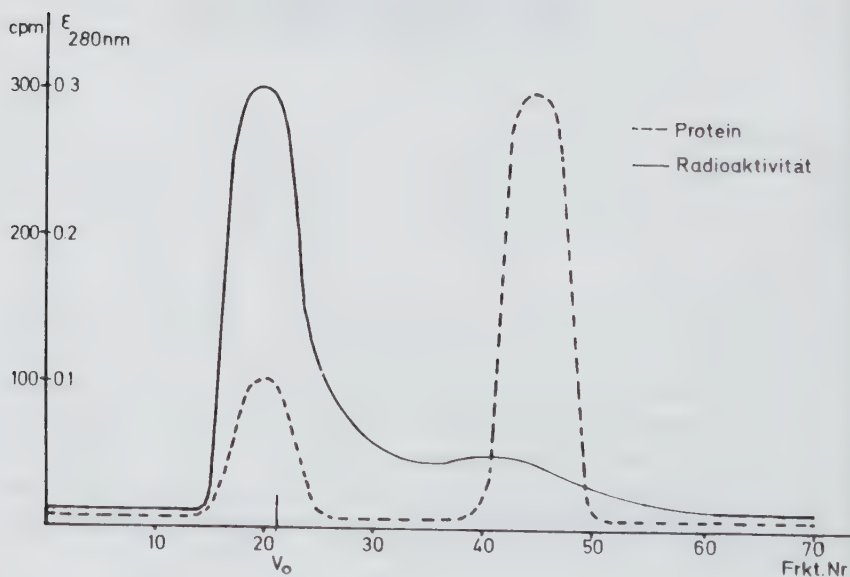


Abb. 16: Gelfiltration von TX 100-Extrakt über Biogel A5m mit 4 M Harnstoff

erhalten. Unter diesen Bedingungen liegt das radioaktive Produkt in großen Aggregaten (Micellen, Vesikel) vor, die Protein enthalten. Ob Protein in kovalenter Bindung an das Mannan vorliegt, oder ob es assoziativ gebundener Teil einer Micelle ist, kann aus den Ergebnissen nicht geschlossen werden. Die Bedeutung des mit TX 100 extrahierten radioaktiven Materials für die serologische Charakterisierung des Produktes der 09-Mannan in vitro Synthese ist in Abschnitt 3 und 8 dargestellt.

4.1.2 Extraktion mit 45 % Phenol bei 4°C

Als weitere Methode zur Solubilisierung der Carrier-Mannan-Verbindung verwendeten wir die Extraktion mit Phenol und Wasser in der Kälte. Mit dieser Methode gelang es aus Gram-positiven Bakterien Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren zu isolieren (Burger und Glaser, 1964). Dabei gehen Polysaccharide und Lipopolysaccharide in die wässrige Phase, während Proteine in der phenolischen Phase erscheinen.

Zur Extraktion wurden 100 µl Membranen aus E. coli F 860 eingesetzt, die in vitro mit GDP-(¹⁴C)-Mannose markiert worden waren. Dazu wurden 100 µl Wasser und 200 µl 90 % Phenol gegeben und die Mischung 2 Stunden bei 4°C geschüttelt. Nach Phasentrennung durch Zentrifugation wurde die Phenol-Phase mit Wasser gewaschen und beide wässrige Phasen vereinigt. Nach zweimaliger Extraktion mit Petroläther/Äther (1 : 1) wurde die nun Phenol-freie wässrige Lösung eingeeengt und für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Da die energiereiche Bindung zwischen Carriermolekül und Mannan durch wässriges Phenol bei 65°C hydrolysiert wird (Kopmann, 1974), war es wichtig, zu untersuchen, ob nach der Extraktion noch der intakte Komplex vorliegt. Dazu wurde der Extrakt in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter-

sucht. Das Radioaktivitäts-Muster im Gel entsprach dem in Abb. 14 gezeigten. Damit ist gezeigt, daß durch kaltes wässriges Phenol die intakte Träger-Mannan-Verbindung extrahiert wird.

Die Gele enthielten kein durch Coomassie Blue anfärbbares Material: Protein-Banden konnten auch bei Auftragung größerer Mengen nicht gesehen werden. Die Frage, ob für die Anfärbung mit Coomassie Blue vielleicht zu wenig Protein vorhanden war, sollte durch eine Protein-Bestimmung geprüft werden. Bei Anwendung der Micro-Folin Methode (Lowry et al., 1951) ist es wichtig, daß die Probe völlig frei von Phenol ist. Wir haben daher das durch Phenol-Wasser extrahierte radioaktive Material nach Extraktion mit Petroläther-Äther durch Chromatographie an Sephadex G 50 weitergereinigt. Mit der Methode nach Lowry konnte in der Präparation kein Protein gefunden werden.

4.1.3 Reinigung der Carrier-Mannan-Verbindung durch Affinitätschromatographie

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, daß der mit wässrigem Phenol isolierte Carrier-Mannan-Komplex kein nachweisbares Protein enthält. Um auch die Anwesenheit anderer Verunreinigungen und kleinster Mengen von Protein, von Peptid oder von Aminosäure auszuschließen, reinigten wir das Produkt vor weiterer Analyse spezifisch durch Affinitätschromatographie.

Dazu haben wir die Tatsache ausgenützt, daß das 09-Mannan α -1,2 gebundene Mannose enthält. Das Mannan bindet damit sehr stark Concanavalin A (Goldstein und Hollermann, 1965; Sharon und Lis, 1972; Lis und Sharon, 1973). Dieses Lectin ist spezifisch für α -gebundene Mannose, die entweder terminal (wie z.B. in α -Methylmannosid) oder 1,2-gebunden ist. Da die 2-Position am Zuckerring für die Bindung nicht wichtig ist, wird auch α -

Glucose und, in geringerem Maße, α -N-Acetylglucosamin an Concanavalin A gebunden. Das 09-Mannan kann sowohl frei als auch an das Carriermolekül gebunden, durch Affinitätschromatographie gereinigt werden. Diese beruht auf der spezifischen Bindung einer Substanz (z.B. Kohlenhydrat) an einen Träger-gebundenen Reaktionspartner (z.B. Protein) und der spezifischen Elution durch den entsprechenden Liganden (z.B. Glycosid oder Oligosaccharid). Sie ist mehrfach beschrieben und in ihrer Anwendung diskutiert worden (Bende, 1974; Cuatrecasas, 1972a).

Wir verwendeten zur Reinigung des Carrier-Mannan-Komplexes die Affinitätschromatographie an Concanavalin A, das an Sepharose 4 B gebunden war. Da die Zucker-Bindungsstellen am Concanavalin A durch die zweiwertigen Metallionen Ca^{++} , Mg^{++} und Ni^{++} aktiviert werden (Kalb und Levitzki, 1968) verwendeten wir einen Puffer, der diese Ionen enthielt. Auf die mit Puffer gewaschene Säule wurde das radioaktiv markierte Material aufgetragen und nacheinander mit Puffer, Puffer mit 0.05 % Triton X 100 und Puffer mit 0.1 M α -Methylmannosid eluiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 17 gezeigt.

Bei Elution mit Puffer und mit TX 100-haltigem Puffer wird keine Radioaktivität eluiert. In Gegenwart von α -Methylmannosid und Spuren von TX 100 wird jedoch die gesamte Radioaktivität in einem scharfen Peak eluiert. Wenn α -Methylmannosid ohne vorherige Elution mit TX 100 verwendet wird, so kann man nur etwa 50 % der Radioaktivität eluieren. Das verbleibende Material läßt sich ebenfalls nur durch α -Methylmannosid in Gegenwart von TX 100 eluieren. Die beiden Fraktionen unterscheiden sich nicht in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

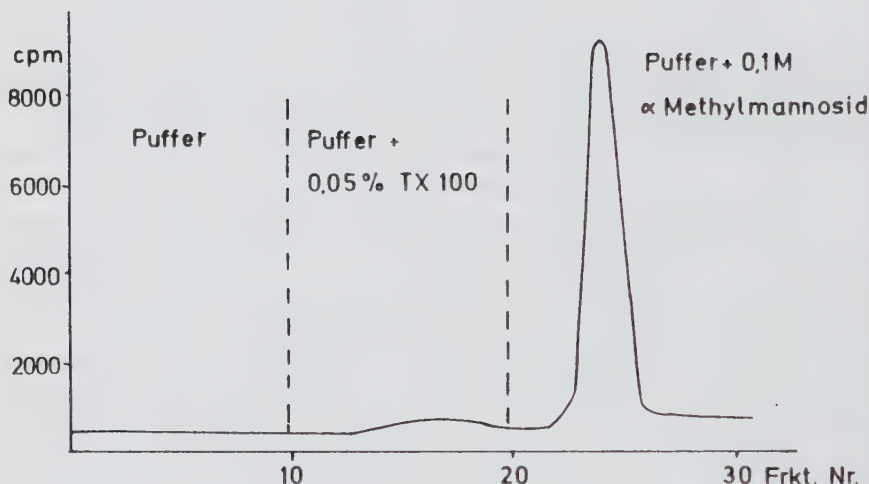


Abb. 17: Affinitätschromatographie an Concanavalin A-Sepharose 4 B. Aufgetragenes Material: Mit 45 %igem Phenol bei 4°C extrahierte Carrier-Mannan-Verbindung

Es sei erwähnt, daß die Membranen für die in vitro Synthese aus einer Phosphomannoseisomerase-losen Mutante hergestellt wurden, die in Abwesenheit von Mannose wuchs. Daher enthalten diese Membranen kein bereits in vivo gebildetes komplettes Lipopolysaccharid (O9-Antigen). Die Reinigung des an den Carrier gebundenen O9-Mannans wird daher nicht durch O9-antigenes Lipopolysaccharid gestört.

4.1.4 Präparative SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese der Carrier-Mannan-Verbindung

Nach der spezifischen Reinigung durch Affinitätschromatographie wäre es noch denkbar, daß kleine Peptide (unter der Nachweisgrenze bei der Proteinbestimmung), die assoziativ fest an die Carrier-Mannan-Verbindung gebunden sind, nicht abgetrennt wurden. Um diese im elektrischen Feld abzutrennen, unterwarfen wir das durch Affinitätschromatographie erhaltene radioaktive Produkt einer präparativen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Aus dem Radioaktivitätspeak wurde anschließend das Material eluiert und zur weiteren Charakterisierung der Träger-Mannan-Verbindung im Aminosäure-Analysator untersucht.

Da die Aminosäure-Analyse sehr empfindlich ist, mußten alle verwendeten Reagentien möglichst rein sein. Deshalb wurde Acrylamid und Bismethylenacrylamid aus Chloroform bzw. aus Aceton umkristallisiert und alle Lösungen aus reinsten Reagentien mit bidestilliertem Wasser frisch angesetzt. Für die Elektrophorese wurde gereinigtes Produkt, das ca. 10 000 cpm enthielt, auf das Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese, die in der gleichen Apparatur wie die analytischen Elektrophoresen durchgeführt wurde, wurde die Lage der radioaktiven Bande mit Hilfe eines Leitgels festgestellt und der entsprechende Bereich dann mit bidestilliertem Wasser 12 Stunden lang bei 4°C eluiert. Auf diese Weise wurden ca. 60 % des radioaktiven Materials eluiert. Bei erneuter Auftragung auf ein Gel zeigt diese Substanz die gleiche elektrophoretische Mobilität wie das ursprüngliche Material. Dies zeigt an, daß bei der Elution das intakte Material erhalten wurde.

4.2 Aminosäure-Analyse der aus dem Gel eluierten Carrier-Mannan-Verbindung

Die aus dem Gel eluierte Substanz stellt die bisher reinste Form des Carrier-Mannan-Komplexes dar. Dabei nehmen wir an, daß die Hauptmenge des Materials radioaktives Mannan und nur ein geringer Anteil unmarkiertes Carriermolekül darstellt.

Bei der Aminosäure-Analyse mit dem automatischen Aminosäure-Analysator (Modell 120 B, Beckmann) ist der Nachweis theoretisch ab 0.1 nM möglich, nach praktischer Erfahrung (Kickhöfen und Warth, Max-Planck-Institut Freiburg) werden ab 0.5 nM Aminosäuren deutlich erfaßt. Die spezifische Aktivität des eingesetzten Materials betrug, errechnet aus der spezifischen Aktivität der zur Inkubation eingesetzten GDP-(¹⁴C) Mannose und einer Kettenlänge des Mannans von 60 Mannose-Einheiten (Reske, 1968), ca. 5×10^3 cpm/nM Mannan. Wenn man davon ausgeht, daß eine Aminosäure nur einmal im Trägermolekül vorkommt, so müßten mindestens 2 500 cpm pro Analyse eingesetzt werden, um einen deutlichen Peak bei der Aminosäure-Analyse zu erhalten.

Um eine sichere Aussage zu ermöglichen wurden mehrere Analysen mit jeweils 10 000 cpm durchgeführt. Außerdem wurden als Kontrollen aus Gelen, die unbeladen unter identischen Bedingungen der Elektrophorese unterworfen worden waren, Bereiche ausgeschnitten, die denen der Proben entsprachen. Alle Gele wurden wie beschrieben eluiert. Die Eluate wurden lyophilisiert und die Rückstände mit 6 N HCl bei 110°C 18 Std. in Gegenwart von 0.21 M Dimethylsulfoxyd hydrolysiert. Nach Entfernung der Salzsäure im Vakuum wurden die Proben analysiert. Die Anwesenheit von Dimethylsulfoxyd bei der Hydrolyse bewirkt, daß Cystein, das säurelabil ist, in die säurestabile Cysteinsäure überführt wird und so für die Analyse erhalten bleibt (Spencer und Wold, 1969).

Da zur Analyse Material eingesetzt wurde, das 2 nM Mannan entsprach, erwarteten wir einen Wert von 2 nMol für Aminosäuren, die nur einmal im Carrier vorkommen. Die Differenzwerte von Probe und Kontrolle lagen für keine Aminosäure über 0,5 nMol (Tab. 9). Von Aminosäuren, die nicht in Tabelle 9 aufgeführt sind, wurden keine bestimmbareren Werte gefunden.

Aminosäure	Probe (A)	Blindwert (B) nMol Aminosäure	Differenz
Lysin	0.29	0.13	0.16
Arginin	0.23		0.23
Asparaginsr.	0.96	0.60	0.36
Threonin	0.31	0.18	0.13
Serin	0.86	0.93	-0.07
Glutaminsr.	0.75	0.25	0.50
Glycin	3.49	3.55	-0.06
Alanin	0.81	0.48	0.33
Valin	0.85	0.36	0.49
Isoleucin	0.50	0.27	0.23
Leucin	0.59	0.28	0.31
Phenylalanin	0.09		0.09

Tab. 9: Aminosäuregehalt in Geleluat, das 2 nM Carrier-Mannan-Verbindung enthielt (A) und in Geleluat ohne Carrier-Mannan-Verbindung (B)

Die gefundenen Differenzwerte wiesen in dem Bereich zwischen 0 und 0,5 nMol bei verschiedenen Analysen Schwankungen auf, so daß auch beim Vergleich mehrerer Analysen kein bestimmtes Verhältnis verschiedener Aminosäuren zueinander gefunden werden konnte. Aus diesen Ergebnissen schlossen wir, daß das Carriermolekül kein Peptid ist.

4.3 Einwirkungen von Proteasen auf die Carrier-Mannan-Verbindung

Die Annahme, daß es sich beim Carriermolekül nicht um ein Peptid handelt, wird neben dem Ergebnis der Aminosäurenanalysen weiter bestärkt durch das Ergebnis, welches bei der Behandlung des Carrier-Polysaccharid-Komplexes mit Proteasen erhalten wurde.

Membranpräparationen nach in vitro Inkubation mit GDP- ^{14}C -Mannose, sowie daraus erhaltene TX 100-Extrakte und Phenol-Wasser-Extrakte (bei 4°C), wurden mit Trypsin, Chymotrypsin, Nagarse, Bromelin und Pronase E inkubiert und dann in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht (Abb. 18). Zur Kontrolle wurde ein Gel mit der entsprechenden unbehandelten Carrier-Mannan-haltigen Präparation verglichen.

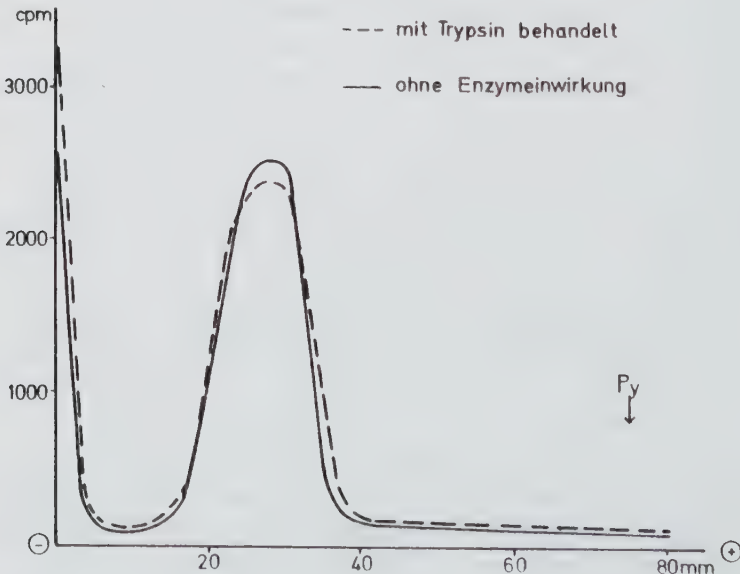


Abb. 18: Einwirkung von Trypsin auf die mit 45 %igem Phenol extrahierte Mannan-Carrier-Verbindung. Die Gele der Inkubationen mit den Enzymen Chymotrypsin, Nagarse, Bromelin und Pronase E und den Substratpräparationen TX 100 Extrakt und L-Bande zeigten das gleiche Radioaktivitätsprofil.

Die Laufeigenschaften des radioaktiven Materials in den Gelen wurde durch die Inkubation mit den Proteasen nicht wesentlich verändert. Daraus kann man schließen, daß das Carrier-Molekül gegen die verwendeten Proteasen resistent ist. Ein proteolytischer Abbau eines Peptid-Carriermoleküls sollte zur Herabsetzung der hydrophoben Wechselwirkung mit SDS und damit zu einer geringeren elektrophoretischen Mobilität des Carrier-Mannan-Komplexes führen. Dies wurde nicht beobachtet. Da das Ergebnis auch nach 24-stündiger Inkubation unverändert war, ist sterischer Schutz vor der Enzymwirkung durch Proteine in der Nachbarschaft des Carriermoleküls nicht wahrscheinlich.

4.4 Zusammenfassung von Kapitel 4

Durch die Solubilisierung von Membranpräparationen mit Triton X 100 ist es gelungen, die Carrier-Mannan-Verbindung aus der Membran zu lösen und anzureichern. Der TX 100-Extrakt enthält jedoch noch große Mengen Protein, die zum Teil an die Carrier-Mannan-Verbindung assoziiert sind und auch durch Gel-filtration in Gegenwart von 4 M Harnstoff nicht abgetrennt werden können.

Bei der Extraktion mit 45 % Phenol bei 4°C wurde in der wässrigen Phase die Carrier-Mannan-Verbindung nachgewiesen. Es konnten in diesem Extrakt nach Chromatographie an Sephadex G 50 keine meßbaren Mengen an Protein gefunden werden.

Zur spezifischen Reinigung wurde die Affinitätschromatographie an Concanavalin A eingesetzt. Die Carrier-Mannan-Verbindung wird spezifisch gebunden und kann in Gegenwart von geringen Mengen TX 100 mit α -Methylmannosid wieder eluiert werden. Die gereinigte Carrier-Mannan-Verbindung unterwarfen wir anschließend der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, um im

elektrischen Feld eventuell assoziierte kleine Peptide abzutrennen. Sie wären wegen ihrer geringen Menge von der Proteinbestimmung im Phenol-Wasser-Extrakt vielleicht nicht erfaßt und bei starker Assoziation durch die Affinitätschromatographie nicht abgetrennt worden.

An dem aus den Gelen eluierten radioaktiven Material wurden Aminosäureanalysen durchgeführt. Es konnten gegenüber den Kontrollen keine signifikanten Mengen an Aminosäuren gefunden werden. Aus diesem Ergebnis schließen wir, daß das Trägermolekül kein Peptid ist.

Bestärkt wird diese Annahme auch durch folgendes Ergebnis: Die Einwirkung von verschiedenen Proteasen auf die Carrier-Mannan-Verbindung hat keinen Einfluß auf deren Wanderungsverhalten in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Daraus muß geschlossen werden, daß das Carriermolekül unter diesen Bedingungen nicht proteolytisch abgebaut werden kann.

Die Tatsache, daß der Carrier kein Peptid ist, läßt erwarten, daß es sich um ein Lipoid handelt, auch wenn dieses mit organischen Lösungsmitteln bisher nicht extrahiert werden konnte (Kopmann, 1974; Flemming, 1976). Das ließe sich so erklären, daß entweder der Carrier fest an Membranproteine seiner Umgebung assoziiert und damit nicht extrahierbar ist, oder daß bei den Extraktionen die am Carrier wachsende hydrophile Zuckerkette bereits zu lang war, um in organischen Lösungsmitteln extrahierbar zu sein.

5. Untersuchungen an einer UDP-Glucose-Pyrophosphorylase-losen Mutante

Während der hier beschriebenen Untersuchungen konnten Flemming und Jann (1978) am reduzierenden Ende des O9-Mannans Glucose nachweisen. Daraus kann man schließen, daß die Synthese mit der Glucosylierung eines hydrophoben Carriermoleküls beginnt und die Mannankette dann am nicht-reduzierenden Ende weiterwächst.

Es sollte in diesem Zusammenhang erwähnt werden, daß die Mannan-Synthese bei E. coli F 860 Bakterien in vitro manchmal nur schlecht verläuft. Aus der Tatsache, daß die Glucosylierung ein wichtiger Schritt bei der O9-Antigen-Synthese ist, ergab sich die Vermutung, daß die schwankende Mannan-synthese-Aktivität mit dem Glucose-Gehalt im Medium, der nicht immer konstant war, zusammenhängt.

Aufgrund dieser Ergebnisse untersuchten wir die Glucosylierung, und es erschien uns dazu wünschenswert, eine Mutante zu isolieren, die keine UDP-Glucose synthetisiert. Der E. coli Stamm F 860, der uns bisher zur Verfügung stand, war eine unkapselte (K^-) Phosphomannose-Isomerase-lose (pmi^-) Mutante aus E. coli O9:K29. Bei einem zusätzlichen Defekt des $galU$ -Genortes ($galU^-$) fehlt das Enzym UDP-Glucose-Pyrophosphorylase und es kann somit keine UDP-Glucose gebildet werden (Abb. 6). Die in vitro Synthese des O9-Mannans sollte in einer pmi^- , $galU^-$ -Mutanten von der Anwesenheit sowohl von UDP-Glucose als auch von GDP-Mannose abhängen.

5.1 Isolierung

Die K^- pmi^- Mutante F 860 kann in Abwesenheit von Mannose zwar kein Mannan, aber komplettes Core-Oligosaccharid bilden.

Die von uns gesuchte Mutante mit dem $galU^-$ -Defekt kann wegen der Abwesenheit von UDP-Glucose das Core-Oligosaccharid nur unvollständig synthetisieren. Diese Tatsache haben wir ausgenutzt, um mit Hilfe eines R-spezifischen Bakteriophagen (6SR); dessen Rezeptor das vollständige Core-Oligosaccharid ist, eine $galU^-$ -Mutante zu isolieren.

Eine in Abwesenheit von Mannose in Loeb-Medium gezüchtete Kultur von E. coli 09 Stamm F 860 wurde mit 6SR-Phagen infiziert und aus dem Lysat wurden 6SR-resistente Mutanten isoliert. Von ihnen wurden einige, die in Gegenwart von Galactose und in Abwesenheit von Mannose auf Loeb-Agar als 6SR-resistente R-Formen wuchsen, auf UDP-Glucose-Pyrophosphorylase-Aktivität getestet und in Phagentests genauer untersucht. Die von uns ausgewählte Mutante F 988 hatte das folgende Phagemuster:

Getestet auf	Bakteriophagen								S-spezifisch	
	R-spezifisch									
	Br 2	Br 10	Br 30	FP ₁	FP ₃	C ₂₁	6SR	08	09	
Loebagar	-	+	+	+	-	+	-	-	-	
Loebagar + Mannose	-	+	+	+	-	+	-	-	-	
Loebagar + Galaktose							-			

Tab. 10: Phagemuster der pmi^-galU^- -Mutante F 988 aus E. coli 09:K29⁻

Die Mutante hatte außerdem als genetische Markierung einen his^- -Defekt, war Streptomycin-sensitiv und konnte weder Mannose noch Galaktose verwerten.

5.2 Bestimmung der UDP-Glucose-Pyrophosphorylase-Aktivität

Um die $galU^-$ -Mutation biochemisch zu testen, bestimmten wir in F 988 die UDP-Glucose-Pyrophosphorylase-Aktivität und verglichen sie mit der im Ausgangsstamm F 860. Wir führten den Test wie von Olson et al. (1969) beschrieben durch. Dabei wird bei Anwesenheit aller Enzyme, also auch UDP-Glucose-Pyrophosphorylase, und anorganischem Pyrophosphat nach den in Abb. 19 dargestellten Reaktionsschritten UDP-Glucose irreversibel in Gluconsäure überführt. Die damit verbundene Reduktion von NADP läßt sich spektrophotometrisch bei 365 nm verfolgen.

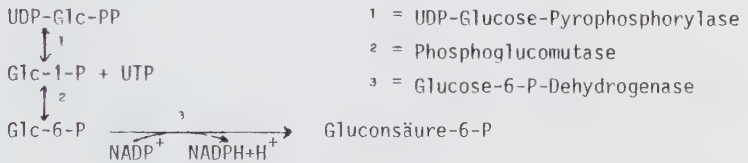


Abb. 19: Reaktionsfolge beim Test auf UDP-Glucose-Pyrophosphorylase

Als UDP-Glucose-Pyrophosphorylase-haltige Präparation verwendeten wir Bakterienextrakt. Dieser wurde aus Ultraschall-behandelten Bakterien nach halbstündiger Zentrifugation bei 15 000 g gewonnen. Der Überstand wurde zum Test eingesetzt.

Die Reaktionsmischungen enthielten in Tris-Puffer pH 7,5: UDP-Glucose, NADP, Phosphoglucoisomerase, Glucose-6-P-Dehydrogenase und Bakterienextrakt. Nach 5 Minuten wurde Natriumpyrophosphat zugegeben.

Abb. 20 zeigt, daß im Stamm F 988 die UDP-Glucose-Pyrophosphorylase nicht mehr aktiv ist.

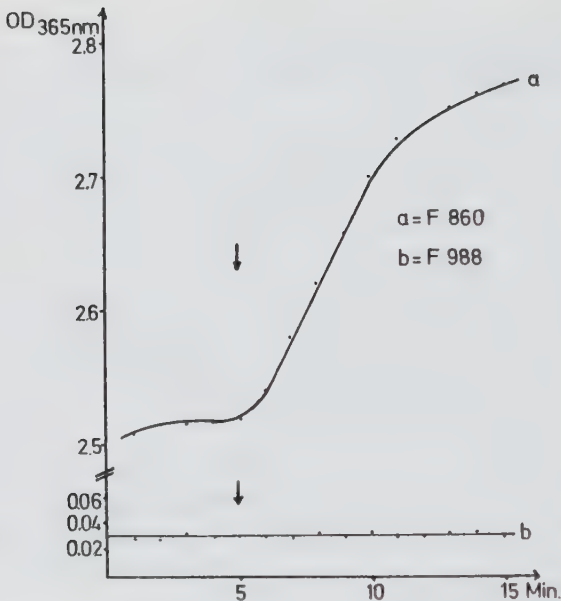


Abb. 20: Test auf UDP-Glucose-Pyrophosphorylase bei *E. coli* F 860 und F 988. Veränderung der Extinktion durch Zunahme von NADPH in Abhängigkeit von der Zeit

5.3 Bestimmung der Phosphoglucoseisomerase-Aktivität

Wie in Kap. 5.4 genauer beschrieben, stellten wir bei dem *Coli*-Stamm F 988 eine Abhängigkeit der Biosynthese des 09-Antigens von der Gegenwart von Glucose im Medium fest. Dies führte zu der Überlegung, daß dafür unter Umständen ein Defekt der Phosphoglucoseisomerase (PGI) verantwortlich sein könnte.

In einer *pgi*⁻-Mutante kann Fructose-6-Phosphat nicht in Glucose-6-Phosphat überführt (Abb. 6) und somit Glucose nicht aus dem allgemeinen Stoffwechsel bezogen werden. Die Bildung von Glucose-Derivaten ist in einer solchen Mutante nur bei An-

wesenheit von Glucose möglich.

Der Test wurde wie von Olson et al. (1969) beschrieben durchgeführt. Dabei wird in Anwesenheit von Phosphoglucoseisomerase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, wie in Abb. 21 dargestellt, Fructose-6-Phosphat in Gluconsäure-6-Phosphat überführt. Die damit verbundene Zunahme von NADPH wird spektrophotometrisch bei 365 nm gemessen.

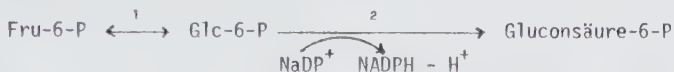


Abb. 21: Reaktionsfolge beim Test auf Phosphoglucoseisomerase-Aktivität

¹ = Phosphoglucoseisomerase

² = Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Das in Abb. 22 dargestellte Ergebnis zeigt, daß die E. coli Stämme F 860 und F 988 beide Phosphoglucoseisomerase-Aktivität besitzen. Sie können also Glucose-6-Phosphat aus dem Zuckerstoffwechsel über Fructose-6-Phosphat beziehen.

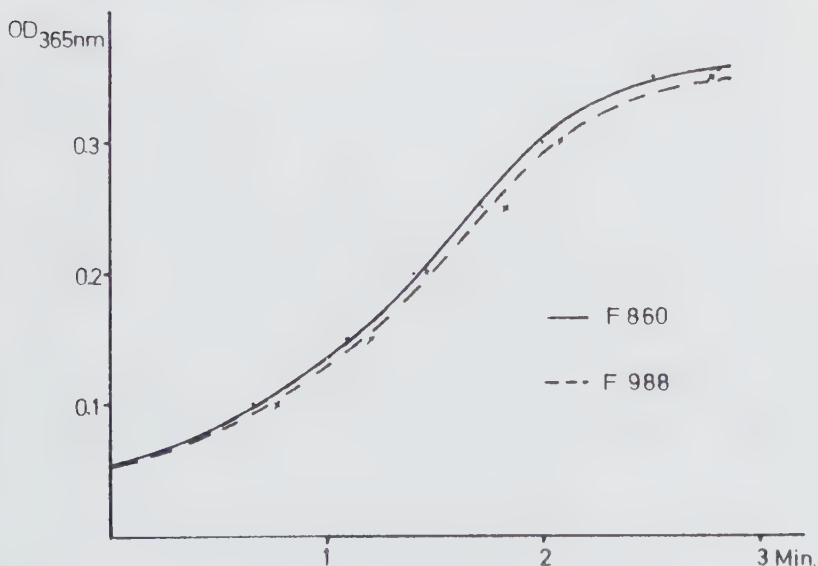


Abb. 22: Test auf Phospho-Glucose-Isomerase bei E. coli F 860 und F 988. Veränderung der Extinktion durch Zunahme von NADPH in Abhängigkeit von der Zeit.

Aus diesem Ergebnis schließen wir, daß die Glucose-Abhängigkeit, die bei der Synthese des 09-Mannans beobachtet wurde, nicht von einem Defekt der Phosphoglucoseisomerase herrührt.

5.4 Glucosylierung des Carriers

Da die Doppelmutante pmi^- , galU^- keine UDP-Glucose synthetisiert, erwarteten wir einen in vitro-Einbau von Mannose aus GDP-Mannose nur, wenn zuvor durch Zugabe von UDP-Glucose Glucose auf den Carrier übertragen wurde. Es sollte im folgenden Versuch der Carrier in vitro glucosyliert werden.

Wir inkubierten deshalb EDTA-Präparationen aus F 988 Bakterien, die in L-Broth ohne Glucose gewachsen waren, mit $\text{GDP-}^{14}\text{C}$ -Mannose in Gegenwart von UDP-Glucose im Inkubationsgemisch. Wir konnten hierbei keinen in vitro-Einbau von ^{14}C -Mannose messen:

Die EDTA-Präparationen aus dem Stamm F 988 waren nicht in der Lage, in vitro aus GDP-Mannose und UDP-Glucose das 09-spezifische Polysaccharid zu bilden.

Dieses Ergebnis führte zu der Annahme, daß in diesem in vitro-Synthese-System Glucose nicht auf den Carrier übertragen werden kann und deshalb das Mannan nicht synthetisiert wird. Der Grund dafür könnten labile Transferasen sein, die in der EDTA-Präparation von F 988 Bakterien nicht mehr aktiv sind. Es wäre aber auch denkbar, daß Glucose durch einen anderen Nucleotidzucker als UDP-Glucose übertragen wird.

Schon bei früheren Versuchen beobachteten wir, daß F 860 Bakterien oft wenig Mannan-Synthese-Aktivität besitzen, wenn sie in Medium mit geringer Glucosekonzentration gewachsen waren. Da wir im vorhergehenden Versuch, bei der Inkubation

von F 988 Bakterien, die glucosefrei gewachsen waren, keine Mannan-Synthese-Aktivität fanden, untersuchten wir auch bei der Mutanten F 988 die Mannan-Synthese-Aktivität in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration im Wachstumsmedium. F 988 Bakterien wurden in L-Broth (Luria, 1957) ohne und mit 0,5 % Glucose gezüchtet. Diese Bakterien behandelten wir mit EDTA und inkubierten die so erhaltene Enzympräparation mit GDP-¹⁴C-Mannose. Wir fanden (Tab. 11), daß bei der in vitro-Synthese nur dann Mannose aus GDP-Mannose eingebaut wird, wenn die Bakterien in Gegenwart von Glucose gewachsen waren.

L-Broth	mit 0.5 % Glucose	ohne Glucose
nMol Mannose in 10 Minuten eingebaut	550	75

Tab. 11: in vitro Einbau von Mannose aus GDP-Mannose bei Präparationen aus F 988 Bakterien, die mit oder ohne Glucose gewachsen waren

Die Abhängigkeit der Mannan-Synthese-Aktivität von Glucose im Medium ist bei der Mutanten F 988 besonders ausgeprägt.

Wir nehmen an, daß die Glucose-Abhängigkeit der 09-Mannan-Biosynthese darauf zurückzuführen ist, daß bei glucosefrei gewachsenen Bakterien der Carrier nicht glucosyliert wird und somit der Akzeptor, auf den Mannose übertragen wird, nicht gebildet wird. Unter dieser Voraussetzung schließen wir aus der Tatsache, daß in der galU⁻-Mutanten, die keine UDP-Glucose bilden kann, in vivo Glucose übertragen wird, daß Glucose durch einen anderen Nucleotidzucker als UDP-Glucose übertragen wird.

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann jedoch die Ursache für die Glucoseabhängigkeit nicht geklärt werden. Die Bakterien sind offenbar nicht in der Lage, aus einer anderen Kohlenstoffquelle im Medium die für die Glucosylierung des Carriers erforderliche aktivierte Form der Glucose zu bilden. Ein Defekt der Phosphoglucose-Isomerase ist, wie in Kap. 5.3 gezeigt, dafür nicht verantwortlich.

In einem weiteren Versuch untersuchten wir die Wirkung von UDP-Glucose im Inkubationsansatz bei der in vitro Synthese des 09-Mannans mit EDTA-Präparationen aus Bakterien, die in glucosehaltigem Medium gezüchtet wurden. Tab. 12 zeigt eine deutliche Hemmwirkung von UDP-Glucose auf den in vitro Einbau von Mannose. Dieses Phänomen läßt sich noch nicht erklären, aber es bestärkt die Annahme, daß Glucose von einem anderen Nucleotidzucker als UDP-Glucose übertragen wird.

	ohne UDP-Glucose	mit UDP-Glucose
nMol Mannose in 10 Minuten eingebaut	550	340

Tab. 12: in vitro Einbau von Mannose aus GDP-Mannose mit und ohne UDP-Glucose im Inkubationsansatz. Es wurden Präparationen aus F 988 Bakterien, die in glucosehaltigem Medium gewachsen waren, verwendet

5.5 Nachweis von Glucose am 09-Antigen

Aus den in 5.4 dargestellten Ergebnissen haben wir geschlossen, daß der Carrier in vivo bei Anwesenheit von Glucose im Medium glucosyliert werden kann und daß dann in vitro durch Mannose-Übertragung aus GDP-Mannose das 09-Mannan wächst. Das sollte analytisch überprüft werden. Dazu wurde der Carrier zunächst in vivo mit ^{14}C -Glucose und dann in vitro mit nicht radioaktiver GDP-Mannose inkubiert. In dem isolierten Produkt sollte radioaktive Glucose nachweisbar sein.

Aus F 988 Bakterien, die in Gegenwart von ^{14}C -Glucose gewachsen waren, stellten wir eine EDTA-Präparation der Bakterien her. Diese inkubierten wir mit GDP-Mannose und anschließend spalteten wir mit 0.01 N Salzsäure (30 Min./100°C) das Polysaccharid vom Carrier ab. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit dem abgespaltenen Polysaccharid neutralisiert und über Sephadex G 50 gereinigt. Dieses Material unterwarfen wir einer Totalhydrolyse (1 N HCl/2 Std./100°C). Die anschließend lyophilisierte Probe wurde dann in wenig Wasser aufgenommen und auf Papier in Gegenwart von Pyridin/Butanol/Wasser chromatographiert. Als innerer Standard wurde ^3H -Glucose zusammen mit der Probe aufgetragen. (Abb. 23).

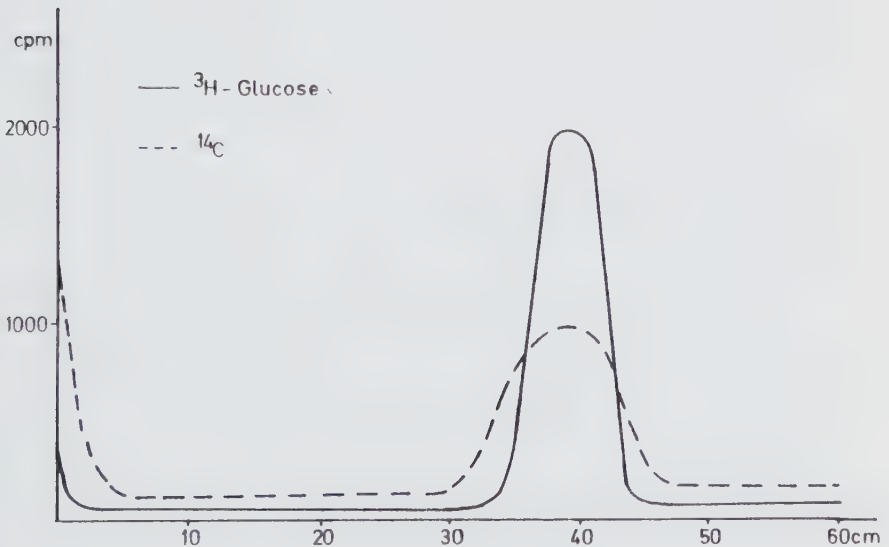


Abb. 23: Papierchromatographische Identifizierung der Glucose am 09-Mannan von F 988 Bakterien

Dieses Ergebnis bestätigt, daß F 988 Bakterien die aus dem Medium angebotene Glucose in vivo zur Glucosylierung des Carriermoleküls verwenden können. Die Übertragung von Mannose kann dann ohne Beteiligung zweiwertiger Ionen (Kopmann und Jann, 1975) in vitro ablaufen.

5.6 Zusammenfassung von Kapitel 5

Durch Selektion mit dem Core-spezifischen 6SR-Phagen ist es gelungen, aus dem 09:K29⁻-Stamm F 860 eine UDP-Glucose-Pyrophosphorylase-Mutante F 988 zu isolieren.

Bei dieser Mutante ist die Synthese des 09-Mannans abhängig von der Anwesenheit von Glucose im Medium. Nur Bakterien, welche in Gegenwart von Glucose gewachsen waren, bilden das Mannan in vivo und daraus hergestellte EDTA-Präparationen bilden es in vitro.

Die Mutante bildet keine UDP-Glucose, ist jedoch in der Lage, in vivo in Gegenwart von Glucose im Medium den Carrier zu glucosylieren. Dies wurde durch Markierung mit ¹⁴C-Glucose papierchromatographisch nachgewiesen.

Wir schließen daraus, daß Glucose nicht durch UDP-Glucose auf den Carrier übertragen wird. Diese Annahme wird bestärkt durch folgende Ergebnisse: Bei in vitro Inkubation von Bakterien, die ohne Glucose gewachsen waren, kann durch Zugabe von UDP-Glucose kein Mannoseeinbau erreicht werden und bei Bakterien, die mit Glucose gewachsen waren, hemmt die Gegenwart von UDP-Glucose bei der Inkubation den Mannoseeinbau.

Das Phänomen der Glucoseabhängigkeit kann jedoch durch die vorliegenden Ergebnisse nicht abschließend erklärt werden, da wir nicht wissen, warum die Bakterien in vivo nicht in der Lage sind, Glucose für die Glucosylierung des Carriers aus dem allgemeinen Stoffwechsel zu beziehen. Ein Defekt der Phosphoglucoseisomerase liegt nicht vor und kann dafür nicht verantwortlich sein.

6. Extraktion einer an Lipoid gebundenen Synthese-Zwischenstufe

Im Gegensatz zu anderen Synthesystemen bakterieller Polysaccharide (Hemming, 1974; Lennarz und Scher, 1972) wurde bei der Synthese des O-Antigens in E. coli 09 keine lipoidgebundene Zwischenstufe gefunden. Nach den jetzt vorliegenden Ergebnissen wird das 09-Mannan vermutlich so synthetisiert, daß das Polysaccharid an einem Carriermolekül durch schrittweise Verlängerung am nicht-reduzierenden Ende wächst (single chain-Mechanismus), (Kopmann und Jann, 1975; Flemming, 1976).

Die bisherigen Experimente zur Isolierung einer Lipoid-Zwischenstufe im 09-Synthese-System wurden im Prinzip so durchgeführt, daß nach in vitro Inkubation mit GDP-¹⁴C-Mannose eine Extraktion mit organischen Lösungsmitteln erfolgte. Die Tatsache, daß es mit dieser Methode nicht gelang, eine Lipoid-Zwischenstufe zu isolieren, konnte auch darauf zurückgeführt werden, daß schon nach sehr kurzer Inkubationszeit eine für Lipoid-Extraktion zu lange Zuckerkette anpolymerisiert war. Das aus vielen Polysaccharidsynthesen bekannte Carrier-Lipid Bactoprenolphosphat läßt sich nicht mehr mit Chloroform-Methanol oder Butanol extrahieren, wenn es mehr als acht Zuckerreste trägt (Kent und Osborn, 1968).

Wenn bei der Biosynthese des 09-Antigens von E. coli ein Carrier-Lipoid beteiligt ist, so müßte dieses in Abwesenheit von Mannose, nur mit Glucose beladen, nach dem üblichen Verfahren mit Chloroform-Methanol (2 : 1) oder Butanol extrahierbar sein. Wir versuchten deshalb, Bakterien mit ¹⁴C-Glucose zu markieren, um dann mit organischen Lösungsmitteln an den Carrier gebundene Glucose zu extrahieren. Dabei war durch den Defekt der Phosphomannose-Isomerase ausgeschlossen, daß die Glucose im bakteriellen Stoffwechsel zu Mannose umgesetzt werden konnte.

6.1 Extraktion mit Chloroform/Methanol nach in vivo Inkubation mit ^{14}C -Glucose

In Kapitel 5 wurde gezeigt, daß bei in vitro Experimenten Glucose nicht durch UDP-Glucose übertragen werden kann. Weil die entsprechende Nucleotidzuckervorstufe für die in vitro Synthese des O9-Polysaccharids nicht bekannt ist, versuchten wir die Bakterien in vivo mit ^{14}C -Glucose zu markieren.

Bei dieser Methode mußten wir auch Umsetzungen der Glucose erwarten, da der Stamm F 988 eine intakte Phosphoglucose-isomerase besitzt. Um die Dissimilationsrate relativ niedrig zu halten, inkubierten wir zunächst nur kurze Zeit (5 Min.). Wie jedoch Abb. 24 zeigt, nimmt der Radioaktivitätseinbau in Chloroform-Methanol-extrahierbares Material auch bei längerer Inkubationszeit nicht mehr wesentlich zu.

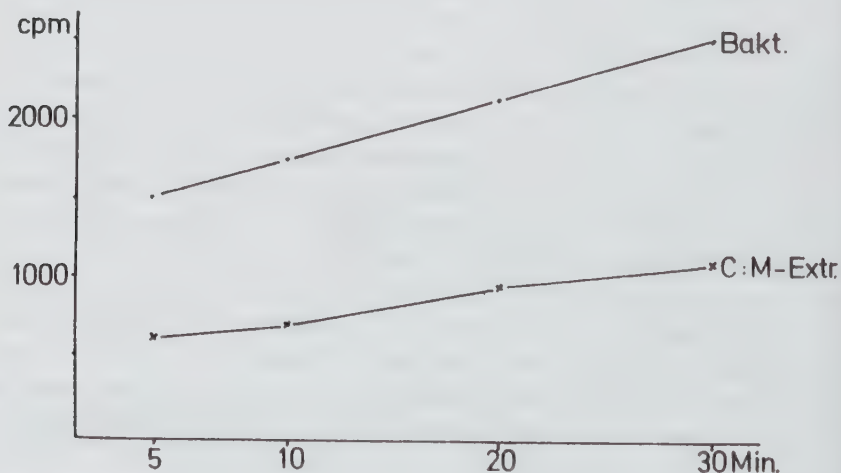


Abb. 24: In vivo Einbaukurve für ^{14}C -Glucose in Bakterien und Chloroform-Methanol-Extrakt bei E.coli F 988. Die Bakterien wuchsen in 5 ml L-Broth mit 0.5 % Glucose (750 000 cpm); es wurden Aliquots von 0.5 ml gemessen.

Nach Vorversuchen, in denen wir Inkubations- und Wachstumsbedingungen variierten, erhielten wir nach der folgenden Methode die günstigste Einbaurrate:

F 988 Bakterien wurden etwa 2 - 3 Stunden (bis OD_{600} 1.0-1.1) in 100 ml L-Broth mit 0.5 % Glucose gezüchtet. Die Bakterien wurden dann abzentrifugiert und in 10 ml L-Broth mit 0.5 % Glucose (1.5×10^6 cpm) 5 Minuten lang inkubiert. Die anschließend zentrifugierten und mit 0.9 %iger NaCl-Lösung gewaschenen Bakterien wurden mit Chloroform-Methanol (2 : 1) extrahiert. Etwa 20 % der eingebauten ^{14}C -Aktivität waren mit Chloroform-Methanol extrahierbar (Tab. 13).

In Bakterien eingebaute ^{14}C -Glucose	101 500 cpm
mit Chloroform-Methanol extrahiert	19 000 cpm

Tab. 13: Einbau von ^{14}C -Glucose in 100 ml F 988 Bakterien

Ebenso wie mit Chloroform-Methanol konnte auch mit Butanol (Jann und Kanegasaki, persönliche Mitteilung) aus Glucose-markierten Bakterien Radioaktivität extrahiert werden. Dabei ist allerdings noch keine Aussage darüber möglich, welchen Anteil der glucosylierte Carrier an der gesamten, in organischem Lösungsmittel extrahierten, Radioaktivität beträgt.

6.2 Charakterisierung der extrahierten Glucose durch Papierchromatographie

Um lipoidgebundene radioaktive Glucose von anderen aus, Glucose entstandenen radioaktiven Produkten zu unterscheiden, hydrolysierten wir das mit Chloroform-Methanol extrahierte Material und charakterisierten die ^{14}C -Glucose neben einem Standard von ^3H -Glucose papierchromatographisch. Etwa 10 % der aufgetragenen Radioaktivität sind als Glucose zu identifizieren (Abb. 25).

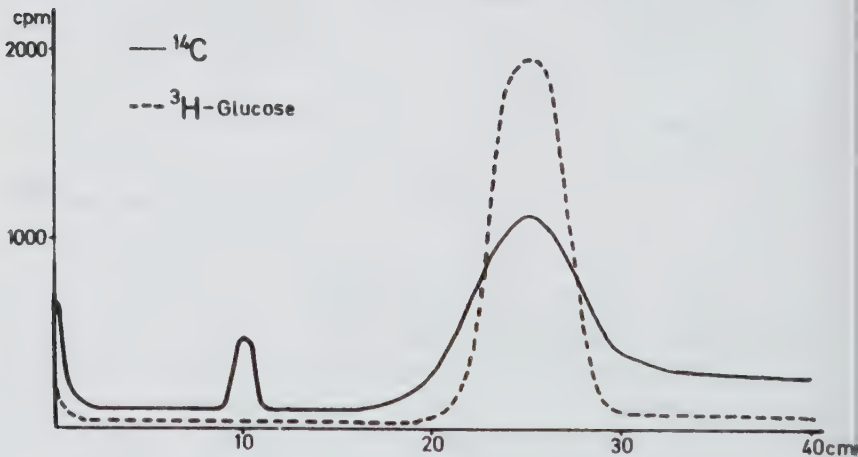


Abb. 25: Radioaktivitätsverteilung im Papierchromatogramm des hydrolysierten Chloroform-Methanol-Extrakts. Der Probe wurde ein Standard von ^3H -Glucose zugefügt.

Damit ist gezeigt, daß mit Chloroform-Methanol lipoidgebundene Glucose extrahiert werden konnte. Vermutlich stellt diese Verbindung den Akzeptor für die Übertragung von Mannose dar.

6.3 Auftrennung der extrahierten Lipide über DEAE-Cellulose

Bei dem Nachweis der Glucose durch Papierchromatographie stellten wir fest, daß nur ein geringer Teil der in dem Chloroform-Methanol-Extrakt enthaltenen Radioaktivität im Chromatogramm gefunden wurde. Dies führten wir darauf zurück, daß ein großer Teil der Radioaktivität in den über Glucose markierten Lipiden enthalten war, die wegen ihrer hohen RF-Werte im Chromatogramm nicht mehr gefunden wurden. Wir haben deshalb die im Chloroform-Methanol-Extrakt enthaltene Lipoidmischung über einer DEAE-Cellulose-Säule nach der Methode von Dankert et al. (1966) fraktioniert.

Die Chromatographie an Diäthylamidoäthylcellulose (DEAE-Cellulose) bewirkt eine Auftrennung der aufgetragenen Substanzen nach ihrer Ladung. DEAE enthält die positiv geladene Gruppe $(C_2H_5O)_2NH_2^+-C_2H_5O-R$ bei pH 7.0, wobei R das Cellulose-Molekül darstellt. Sie ist daher ein Anionenaustauscher. Als Gegenion wird häufig Acetat verwendet. Rouser et al. (1963) beschreiben die Methode, um Lipoidmischungen aufzutrennen. Neutrale Lipide werden von der DEAE-Cellulose-Säule mit polaren Lösungsmitteln eluiert, während Phosphoglyceride, die eine negative Ladung tragen, mit polaren Lösungsmitteln nur in Gegenwart von Salz eluierbar sind.

Wir verwendeten als Elutionsmittel für die Fraktion der neutralen Lipide (Phosphatidyläthanolamin) 99 %iges Methanol und für die geladenen Lipide (Phosphatidylglycerin und

Cardiolipin) einen Ammoniumacetat-Gradienten (0 - 0.4 M) in 99 %igem Methanol.

Auf diese Weise konnte das Gemisch der aus der Zellwand extrahierten Phosphoglyceride gut aufgetrennt werden (Abb. 26), und es zeigte sich, daß bei der in vivo Inkubation mit ^{14}C -Glucose die Lipide deutlich markiert worden waren.

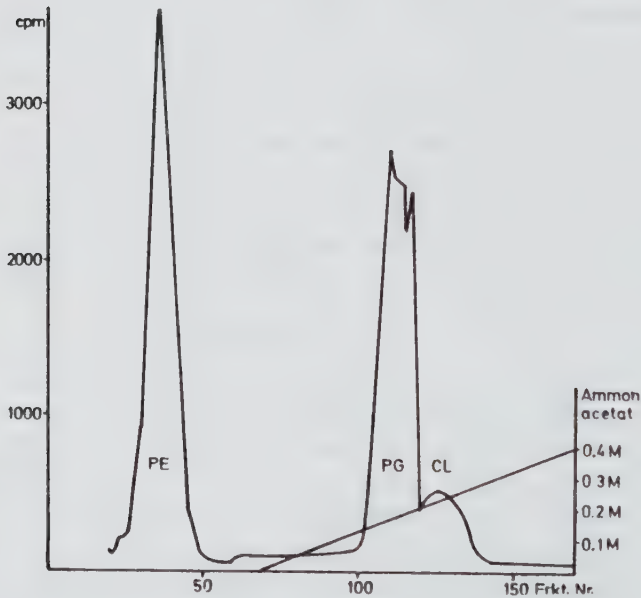


Abb. 26: Chromatographische Trennung der Lipoidfraktion im Chloroform-Methanol-Extrakt über DEAE-Cellulose. Die extrahierten Bakterien waren mit ^{14}C -Glucose in vivo markiert worden.

PE = Phosphatidyläthanolamin
PG = Phosphatidylglycerin
CL = Cardiolipin

In dem zur Chromatographie eingesetzten Chloroform-Methanol-Extrakt war auch das Glucosylcarrierlipid enthalten. Es konnte

jedoch mit dieser Methode chromatographisch nicht charakterisiert werden, da es in zu geringer Menge vorlag.

6.4 Zusammenfassung von Kapitel 6

Durch Extraktion mit Chloroform-Methanol von in vivo mit ^{14}C -Glucose markierten Bakterien ist es gelungen, ein glucosyliertes Lipoid zu isolieren. Die Glucose wurde papierchromatographisch nachgewiesen. Diese Glucose-Lipoid-Verbindung stellt vermutlich den Akzeptor für die Übertragung von Mannose bei der Biosynthese des 09-Mannans dar.

Folgende Erklärungen dafür, daß an Lipoid gebundene Zwischenstufen bei den bisherigen Extraktionsversuchen nach Inkubation mit $\text{GDP-}^{14}\text{C}$ -Mannose nicht isoliert werden konnten, sind möglich:

Nach in vitro Inkubation mit $\text{GDP-}^{14}\text{C}$ -Mannose war schon nach kurzer Zeit die Verbindung durch die wachsende Zuckerkette zu hydrophil, um mit organischen Lösungsmitteln extrahiert zu werden.

In der pmi^- -Mutante, mit der die Extraktionsversuche durchgeführt wurden, ist Glucose nicht über ^{14}C -Mannose oder $\text{GDP-}^{14}\text{C}$ -Mannose markierbar.

Mit Chloroform-Methanol wurden außer der Glucose-Lipoid-Verbindung Lipide und Phosphoglyceride der Bakterienzellwand, die mit ^{14}C -Glucose markiert waren, extrahiert. Durch Chromatographie über DEAE-Cellulose konnte die Lipoidmischung zum Teil aufgetrennt und identifiziert werden. Das Glucose-Carrier-Lipoid war wegen seiner geringen Menge mit dieser Methode nicht zu identifizieren.

7. Rekonstitution des Mannansynthesesystems

In Kapitel 5 wurde gezeigt, daß nur Bakterien, die in Anwesenheit von Glucose gewachsen waren, in der Lage sind, in vivo mit Mannose oder in vitro mit GDP-Mannose das Mannan zu bilden. Dieses Ergebnis und die Extraktion eines glucosylierten Lipoids aus Bakterien, die mit Glucose gewachsen waren, (Kap. 6) deuten darauf hin, daß bei der Synthese des 09-Mannans Mannose auf ein Glucolipoid übertragen wird. Membranen aus Bakterien, die ohne Glucose gewachsen sind, sollten dann möglicherweise durch Zugabe der extrahierten Glucose-Lipoid-Verbindung aus Zellen, die mit Glucose gewachsen sind, rekonstituiert werden und somit das 09-Mannan synthetisieren können.

Eine solche Rekonstitution des 0-Polysaccharid-Biosynthesesystems mit isoliertem exogenem Lipoid-Carrier (Polyprenolphosphat) und einer Enzympräparation konnte Osborn (1969) für S. anatum zeigen. Das Polyprenolphosphat verschiedener Stämme läßt sich dabei auch austauschen. So wurde das Lipoid von M. luteus bei der Biosynthese von Kapselsubstanz bei A. aerogenes eingesetzt und umgekehrt; ebenso das von Staph. aureus in M. luteus und S. typhimurium (Lahav et al., 1969). Die Austauschbarkeit der Carrier-Lipoide ist jedoch noch kein Beweis für ihre strukturelle Identität. Das zeigt auch ein Experiment, in dem Bactoprenol durch synthetisches Ficaprenol ersetzt werden konnte (Lahav et al., 1969).

Um eine lipophile Zwischenstufe der 09-Mannan-Synthese in die Membran von glucosefrei gewachsenen Bakterien integrieren zu können, wurden aus den entsprechenden EDTA-Präparationen mit Hilfe von Lysozym und DNase Membranpräparationen hergestellt. Diese wurden im weiteren Versuch eingesetzt. Um den lipophilen Carrier aus der Butanol-Phase in die wässrige Phase zu überführen, verwendeten wir eine Methode von Kanegasaki und Wright (1970) zur Herstellung einer wässrigen Suspension von Lipoid-

Zwischenstufen. In Anwesenheit von Glucose gezüchtete Bakterien wurden mit Butanol extrahiert (s. Kap. 6), und der Extrakt wurde durch mehrfaches Evaporieren und Zusatz von Wasser in eine wässrige Suspension überführt. Da wir nicht wußten, ob zur Rekonstitution des Synthesystems Hilfslipide erforderlich sind, verwendeten wir den gesamten Butanolextrakt.

Es war von Osborn (1969) gezeigt worden, daß für eine effektive Rekonstitution bakterieller Membranen mit lipoidalen Carrier-Molekülen mehrfaches Einfrieren und Auftauen günstig ist. Das Einfrieren und Auftauen der Enzym-Lipoid-Mischung bewirkt Phasenübergänge in der Membran. Die damit verbundenen strukturellen Veränderungen erleichtern offensichtlich die Integration externer Lipide in die Membran. Wir haben daher die Membranpräparation aus glucosefrei gewachsenen Bakterien zusammen mit dem in wässrige Suspension überführten Butanolextrakt aus Bakterien, die mit Glucose gewachsen waren, fünfmal eingefroren und aufgetaut. Diese Mischung wurde mit GDP-¹⁴C-Mannose inkubiert. Anschließend wurde das gleiche Volumen an 10 % Essigsäure zugegeben, die Mischung über Membranfilter filtriert und mit 5 % Essigsäure gewaschen. Die Filter wurden getrocknet und die Radioaktivität in Szintillationsflüssigkeit gemessen. Das Ergebnis ist in Abb. 27 dargestellt.

Es zeigte sich, daß die Mannansynthese in der Membran von Bakterien, die glucosefrei gezüchtet wurden, durch den Butanolextrakt aus Bakterien, die mit Glucose gewachsen waren, ermöglicht wird. Es wurde in dem untersuchten Bereich eine lineare Beziehung zwischen der Menge an Butanolextrakt und eingebauter ¹⁴C-Mannose gefunden.

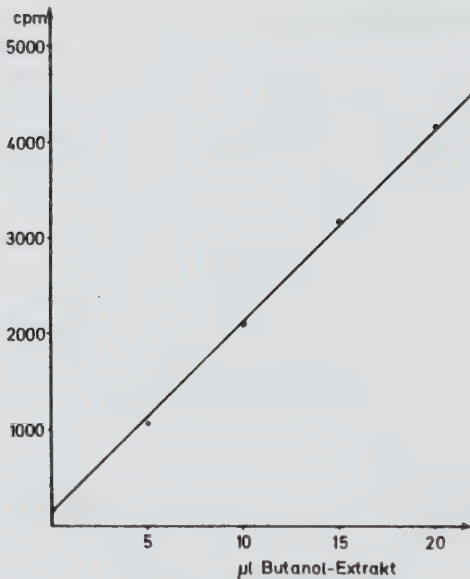


Abb. 27: Mannose-Einbau in Bakterien, die glucosefrei gewachsen sind, in Abhängigkeit von der Menge an zugesetztem Butanolextrakt aus Bakterien, die mit Glucose gezüchtet wurden.

7.2 Zusammenfassung von Kapitel 7

In Membranen aus glucosefrei gezüchteten Bakterien, die nicht in der Lage sind, mit GDP-Mannose das 09-Mannan zu bilden, kann durch Zugabe von Butanolextrakt aus Bakterien, die mit Glucose gewachsen sind (und somit Mannansynthese-Aktivität besitzen), das Manan-Synthesesystem rekonstituiert werden. Der Butanolextrakt enthält die in Kap. 6 beschriebene Glucose-Lipoid-Verbindung.

Wir schließen daraus, daß diese Glucose-Lipoid-Verbindung eine Zwischenstufe im 09-Mannansynthesesystem darstellt. Das bedeutet, daß im ersten Schritt der Biosynthese des 09-Mannans

Glucose auf einen Carrier-Lipoid übertragen und daran dann das Mannan synthetisiert wird. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, daß am reduzierenden Ende des vom Carrier-Lipoid freigesetzten Produkts der in vitro Synthese Glucose gefunden wurde (Flemming und Jann, 1978).

8. Biosynthese des 09-Mannans in Zellextrakten

Schnaitmann (1971 a) zeigte bei E. coli, daß bei der Solubilisierung von Zellhüllen mit Triton X 100 in Gegenwart von Mg^{2+} spezifisch Proteine der zytoplasmatischen Membran in Lösung gehen. Ohne zweiwertige Ionen, in Anwesenheit von EDTA, löst TX 100 auch etwa 50 % der Proteine der äußeren Membran. Außerdem werden mit TX 100 Lipopolysaccharid (mit Mg^{2+} etwa 50 %, mit EDTA 100 %) und Phospholipide solubilisiert. Eine Übersicht über die Wirkung von Detergentien auf Membranen geben Tanford et al. (1976) und Helenius und Simons (1975).

Mit Triton X 100 und anderen nicht ionischen Detergentien (z.B. aus der Tween-Serie) konnten verschiedene integrale Membranproteine solubilisiert werden, die zum Teil noch biologisch aktiv waren (Tzagoloff und Penefsky, 1971). Dies gelang mit Rezeptor-Proteinen (Cuatrecasas, 1972), mit Glycoproteinen aus der Virusmembran (Simons et al., 1973) und mehreren anderen membrangebundenen Enzymen (z.B. Dowhan et al., 1974).

In Kap. 4 wurde gezeigt, daß sich die an die Membran gebundene Carrier-Polysaccharid-Verbindung mit TX 100 solubilisieren läßt, wobei außerdem etwa 60 % der Proteine der zytoplasmatischen Membran in Lösung gehen. Wir fanden, daß die bei der TX 100-Extraktion erhaltenen großen Vesikel nur schwer weiter desintegrierbar sind. Es lag die Überlegung nahe, daß im TX 100-Extrakt das Trägermolekül noch mit den Proteinen seiner ursprünglichen Umgebung in der Membran verbunden sein könnte,

unter anderen auch mit den Enzymen der O-Polysaccharid-Biosynthese, und daß diese Enzyme vielleicht noch ihre biologische Aktivität besitzen. Wir untersuchten deshalb den TX 100-Extrakt auf seine O9-Mannan-Syntheseaktivität.

8.1 Untersuchung der Mannansyntheseaktivität im TX 100-Extrakt

Membranpräparationen von E. coli O9 F 860 wurden mit 0.1 % TX 100 in Gegenwart von 1 mM Mg^{2+} extrahiert. Der Extrakt wurde durch Ultrafiltration auf das Ausgangsvolumen der Membranpräparation konzentriert und mit GDP- ^{14}C -Mannose inkubiert. Das Produkt der Inkubation wurde mit 45 %igem wässrigem Phenol bei 68°C extrahiert und die wässrige Phase wurde zur Entfernung von Substrat auf Papier mit Isopropanol/Ammoniumsulfat chromatographiert. Bei dieser Methode bleibt das gebildete Polysaccharid am Startfleck, während das überschüssige Substrat im Laufmittel wandert. Die am Startfleck gemessene Radioaktivität ist damit ein Maß für die Einbaurrate von Mannose in polymeres Material (Tab. 14).

	0 Min.	15 Min.
cpm am Startfleck	112	1022

Tab. 14: Syntheseaktivität des TX 100-extrahierten Materials aus Membranpräparationen von E. coli F 860

Das Ergebnis zeigt deutlich, daß TX 100-Extrakt nach Inkubation mit GDP-Mannose ein Polysaccharid bildet. Die Aktivität des Mannan-Synthese-Systems bleibt also bei der Solubilisierung mit 0.1 % TX 100 und in Gegenwart von TX 100 während der Inkubation mit GDP-Mannose erhalten.

8.2 Serologische Untersuchung des im TX 100-Extrakt gebildeten Mannans

Es bestand nun die Frage, ob das solubilisierende Synthesesystem das Polysaccharid immer noch in der serologisch aktiven Form bilden kann, oder ob durch den Solubilisierungsvorgang solche Störungen des Enzymsystems entstehen, daß nur noch ein serologisch nicht mehr spezifisches Polysaccharid gebildet wird. Um dies zu untersuchen, testeten wir das im TX 100-Extrakt gebildete Produkt der Mannansynthese im Antigenbindungstest (Rüde et al., 1971).

Wir inkubierten den TX 100-Extrakt einer Membranpräparation von E. coli F 860 mit GDP-¹⁴C-Mannose und entfernten danach das Detergens durch Zugabe von Äthylenglycol/Äthanol. Anschließend trennten wir überschüssiges Substrat durch Chromatographie auf Sephadex G 50 ab. Dieses Produkt wurde dann im Antigenbindungstest mit anti-09, anti-08 und Normalserum eingesetzt. Für eine Bestimmung wurden etwa 6000 cpm des markierten Produkts verwendet. Die Ergebnisse sind in Tab. 15 dargestellt.

	anti 09	anti 08	Normalserum
% cpm präzipitiert mit	46,6	37,3	21,6

Tab. 15: Antigenbindungstest mit in TX 100-Extrakt gebildetem 09-Polysaccharid. Die präzipitierte Radioaktivität wurde als Prozentanteil der gesamten Radioaktivität gemessen.

Das von TX 100-Extrakt gebildete Polysaccharid präzipitiert mit anti-09-Antikörpern. Damit ist gezeigt, daß auch das in TX 100 solubilisierende Enzymsystem das 09-spezifische Polysaccharid bildet. Im Gegensatz zu dem mit Membranen gebildeten Produkt reagiert das mit TX 100-Extrakt gebildete

Polysaccharid jedoch auch mit anti-08-Antikörpern.

8.3 Zusammenfassung von Kapitel 8

Es wurde gezeigt, daß mit TX 100-Extrakt aus Membranpräparationen das Mannansynthesystem unter Erhaltung seiner biologischen Aktivität solubilisiert werden kann. Dieses solubilierte Enzymsystem bildet - auch in Gegenwart von TX 100 - ein Mannan, das 09-Spezifität besitzt.

Im Gegensatz zu dem Produkt, das in Membranpräparationen gebildet wird, kann das Mannan, das mit TX 100-Extrakt synthetisiert wird, mit anti-08-Antikörpern kreuzreagieren. Diese Tatsache zeigt, daß bei der Synthese im Zellextrakt kein reines serologisch einheitliches Produkt mehr gebildet wird. Im 08- und 09-Mannan kommen die gleichen Bindungen vor, jedoch in unterschiedlicher Sequenz. Es ist denkbar, daß durch das Detergens das Enzymsystem, z.B. in der relativen Anordnung der einzelnen Enzyme zueinander so gestört wird, daß die 09-spezifische Sequenz der Bindungen nicht mehr immer eingehalten wird.

Die Solubilisierung des Mannansynthesystems stellt einen ersten Schritt zur Anreicherung und Isolierung der beteiligten Enzyme dar. Dies soll Gegenstand weiterer Untersuchungen sein und dazu beitragen, den Mechanismus der Synthese einer geordneten Struktur mit Wiederholungseinheiten ohne die vorherige Bildung von Oligosacchariden aufzuklären.

9. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen zur Biosynthese des O-Antigens von E. coli 09 und zu seiner serologischen Spezifität beschrieben.

Von Kopmann und Jann (1975), Flemming (1976) und Flemming und Jann (1978) wurde gezeigt, daß das 09-Antigen nach einem anderen Mechanismus gebildet wird, als dem, der bei der Biosynthese des O-spezifischen Polysaccharids in S. typhimurium (Nikaido, 1973; Robbins et al., 1965) beschrieben wurde. Wichtigste Argumente dafür sind das Wachstum des 09-Mannans am nicht-reduzierenden Ende, das aus dem Nachweis der Glucose am reduzierenden Ende geschlossen werden muß, und die Tatsache, daß keine an Lipoid gebundenen Oligosaccharide isoliert werden können.

Die Ergebnisse der weiteren Untersuchungen zu dem Biosynthesemechanismus lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- 1.) Mit dem Detergens Triton X 100 läßt sich aus Membranpräparationen oder aus Ultraschall-behandelten EDTA-Präparationen von Zellen das in vitro gebildete Mannan, gebunden an ein Carriermolekül, solubilisieren. Die Extraktion mit 45 %igem Phenol in der Kälte, eine Methode, die auch zur Isolierung von Teichonsäuren angewandt wurde (Burger und Glaser, 1964), führt ebenfalls zur Extraktion der intakten Carrier-Mannan-Verbindung aus Membranpräparationen oder aus EDTA-Präparationen. TX 100- und Phenol-Wasser-Extrakte zeigen in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese das für die Carrier-Mannan-Verbindung typische Wanderungsverhalten.
- 2.) Durch Affinitätschromatographie an Concanavalin A und durch präparative SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit

anschließender Elution der Gele, wurde die Carrier-Mannan-Verbindung weiter gereinigt.

- 3.) Durch Aminosäureanalysen mit der gereinigten Carrier-Mannan-Verbindung und durch die Einwirkung von Proteasen auf das Trägermolekül konnte gezeigt werden, daß es sich bei dem Carrier, an dem das Mannan gebildet wird, nicht um ein Peptid handelt.
- 4.) Bei einer Doppelmutante von E. coli 09, die UDP-Glucose-pyrophosphorylaselos ($galU^-$) und Phospho-Mannose-Isomeraselos (pmi^-) war, wurde gefunden, daß die Aktivität des Mannansynthesesystems von der Anwesenheit von Glucose im Wachstumsmedium abhängt. Ein Defekt der Phosphoglucose-Isomerase ist dafür nicht verantwortlich. An dieser Mutante wurde auch gezeigt, daß Glucose nicht durch UDP-Glucose auf den Carrier übertragen wird.
- 5.) Aus Bakterien, die mit Glucose gewachsen waren, konnte mit Chloroform-Methanol eine Glucose-Lipoid-Verbindung extrahiert werden. Diese Verbindung stellt vermutlich den Akzeptor für Mannose bei der Biosynthese des 09-Mannans dar.
- 6.) Das Mannan-Synthesesystem konnte rekonstituiert werden: Aus Bakterien, die mit Glucose gewachsen waren, wurde mit Butanol das Gluco-Lipoid extrahiert. Damit wurden Präparationen von Bakterien, die glucosefrei gewachsen waren und keine Mannansyntheseaktivität besaßen, inkubiert. Sie erhielten dadurch die Fähigkeit Mannan zu bilden. Dies zeigt, daß die Gluco-Lipoid-Verbindung eine Zwischenstufe des Mannan-Synthesesystems ist.
- 7.) Mit Triton X 100 kann das Mannan-Synthesesystem unter Erhaltung seiner biologischen Aktivität solubilisiert werden. Das im Zellextrakt gebildete Mannan besitzt 09-Spezifität. Im Gegensatz zu dem Produkt der Biosynthese

in Membranpräparationen zeigt es jedoch auch Kreuzreaktion mit anti-O8-Antikörpern. Eine Erklärung dafür wäre, daß im Detergens die räumliche Anordnung der Enzyme verändert ist und dadurch die Sequenz der Mannose-Übertragung nicht mehr einheitlich O9-spezifisch ist.

- 8.) Das in vitro mit Membranen gebildete Mannan von E. coli O8 und O9 besitzt die entsprechende Antigenspezifität, wenn es an den Carrier gebunden vorliegt. Damit ist gezeigt, daß bei der in vitro-Synthese das komplette O-spezifische Polysaccharid gebildet wird.

Wenn das Produkt vom Carrier abgespalten wird, geht die serologische Spezifität verloren. Daraus schließen wir, daß eine besondere räumliche Anordnung der Mannanketten für die serologische Spezifität erforderlich ist, welche durch Abspaltung des Carriers vom Polysaccharid verloren geht.

10. Diskussion

10.1 Serologische Spezifität des Produkts

Die in dieser Arbeit beschriebenen serologischen Untersuchungen ergaben, daß das Produkt der in vitro Synthese Antigenspezifität besitzt, wenn es an das hydrophobe Carrier-Molekül gebunden ist. Damit ist gezeigt, daß das in vitro synthetisierte Mannan komplett ist. Die serologische Aktivität geht jedoch verloren, sobald das O-spezifische Polysaccharid vom Carrier abgespalten ist und in freier Form vorliegt.

Wir erklären diese Ergebnisse folgendermaßen: Durch die Abspaltung des Polysaccharids wird seine spezifische räumliche Orientierung verändert, die für den Antikörper notwendig ist. Dabei könnte es sich um eine Konformationsänderung der Polysaccharid-Kette handeln. Es ist jedoch noch nicht bekannt, ob das O9-Mannan, wie einige andere Polysaccharide (Rees et al., 1972; Wolf et al., 1978), eine definierte Sekundärstruktur besitzt.

Neben der Sekundärstruktur, welche die räumliche Anordnung innerhalb eines Moleküls bestimmt, kann durch Abspaltung auch die räumliche Anordnung mehrerer Polysaccharidketten relativ zueinander verändert werden. Wenn der Antikörper nicht nur gegen die Struktur einer einzelnen Polysaccharidkette gerichtet ist, sondern z.B. die spezifische Konstellation von Polysaccharidketten zueinander erkennt, so muß die serologische Aktivität verloren gehen, wenn das Mannan durch Abspaltung seine geordnete Umgebung verliert. Die Interpretation, daß die serologische Aktivität von einem kooperativen Effekt abhängt, erscheint auch biologisch sinnvoll, wenn man annimmt, daß es auf der Bakterienoberfläche Bereiche mit unterschiedlicher Lipopolysacchariddichte gibt und daß die zytoplasmatische Membran Bereiche besitzt, in denen bevorzugt die Mannansynthese stattfindet, somit also das Mannan in vivo und in vitro zum Teil in hoher Dichte vorkommt. Die Möglichkeit, daß Mannanketten gebündelt in Form von Micellen vorliegen, wurde auch als "Membraneffekt" bei veränderten Phagenrezeptoreigenschaften von freiem und gebundenem O8-Mannan diskutiert (Prehm und Jann, 1976).

Bei den Untersuchungen zur serologischen Aktivität des O8 und O9-Mannans fiel auf, daß auch bei steigender Konzentration von Antiserum nur eine Präzipitationsrate von etwa 50 % erreicht wird (s. Abb. 13). Nimmt man als Ursache für die serologische Aktivität des Mannans eine Konformationsänderung an, so sollte man erwarten, daß im gebundenen Zustand, d.h. in der serologisch aktiven Konformation, 100 % präzipitieren. Es ist jedoch denkbar, daß die in vitro gebildeten Mannanketten zum Teil noch zu kurz sind um die Überstruktur auszubilden, was eine niedrigere Präzipitationsrate zur Folge hätte. Unter dem Gesichtspunkt des "Membraneffekts" läßt sich die niedere Präzipitationsrate folgendermaßen erklären: Die Membranpräparation enthält nach Inkubation mit GDP-Mannose Vesikel mit unterschiedlicher Mannandichte. Die Population mit der geringeren Dichte bleibt beim Antigenbindungstest im

Oberstand. Der kooperative Effekt ist dann in dem extrahierten Antigenmaterial entsprechend herabgesetzt.

Zusammenfassend kann man aus den Ergebnissen schließen, daß eine bestimmte räumliche Orientierung für die serologische Aktivität der 08 und 09-Antigene verantwortlich ist. Es wird jedoch erst durch künftige Konformationsuntersuchungen zu klären sein, ob eine spezifische Sekundärstruktur des Moleküls immundeterminant ist oder ob der diskutierte "Membraneffekt" beteiligt ist.

10.2 Synthesegenauigkeit des Mannansynthesesystems

Das im TX 100-Extrakt gebildete 09-Mannan zeigt, im Gegensatz zu dem in vitro gebildeten Produkt aus Membranpräparationen, Kreuzreaktion mit anti-08-Antikörpern. Das heißt, daß bei der Synthese im TX 100-Extrakt kein reines, serologisch einheitliches Produkt gebildet wird.

Die Synthese von Wiederholungseinheiten ohne vorgefertigte Oligosaccharide ist nur denkbar als geordnete schrittweise Glycosylübertragung. Sowohl beim 08 wie auch beim 09-Antigen werden die Mannosen durch α -2 und α -3-Mannosyltransferasen übertragen. Es ist möglich, daß bei der Synthese im Detergens-Extrakt α -Mannosyltransferasen des 09-Mannan-Synthesesystems zum Teil inaktiviert sind oder durch eine veränderte räumliche Anordnung in der Detergens-Micelle behindert werden, so daß die Sequenz der Glycosylübertragung gestört ist und dadurch zum Teil auch das sehr ähnliche 08-Antigen entsteht.

Die Empfindlichkeit des Mannan-Synthese-Systems bezüglich seiner Synthesegenauigkeit wurde auch bei folgender Untersuchung beobachtet:

Das Produkt, das von Membranen aus E. coli 09 nach Rekonstitution mit exogenem Gluco-Lipoid gebildet wird, ist kaum mehr serologisch aktiv (Goldemann, pers. Mitteilung). Im Gegensatz dazu kann in S. typhimurium nach Rekonstitution mit Antigen-Carrier-Lipid aus Staph.aureus (Lahav et al., 1969) das serologisch aktive O-sepspezifische Polysaccharid gebildet werden.

Diese Ergebnisse zeigen, daß das Synthesesystem des 09-Antigens bezüglich seiner Genauigkeit wesentlich leichter gestört werden kann, als das O-Antigen-Synthesesystem von S. typhimurium. Dies ist auch verständlich, da die Bildung einer Struktur mit Wiederholungseinheiten ohne die Synthese von Oligosacchariden einen komplizierten Mechanismus erfordert.

10.3 Mechanismus der 09-Mannan Biosynthese

Aufgrund der gefundenen Ergebnisse ist es möglich, den in Abb. 28 schematisch dargestellten Gesamtmechanismus der Biosynthese zu diskutieren.

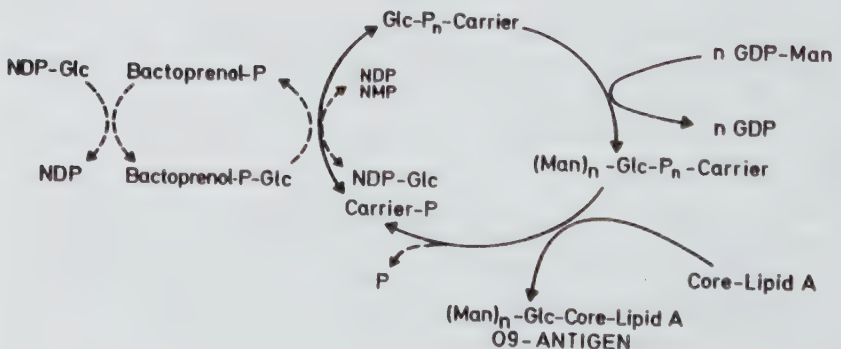


Abb. 28: Modell zum Mechanismus der 09-Mannan-Biosynthese

Die Synthese erfolgt in drei Abschnitten:

- a) Durch die Glucosylierung des Trägermoleküls wird der Akzeptor für die Übertragung von Mannose gebildet.
- b) Auf das Gluco-Lipoid wird Mannose ohne Lipoidbeteiligung aus GDP-Mannose übertragen.
- c) Das gebildete Mannan wird auf Core-Lipoid A übertragen und in die äußere Membran transportiert.

Zu a): Das Trägermolekül, an dem das Mannan gebildet wird, ist kein Peptid und enthält keine Aminosäuren. Es ist zu erwarten, daß es, wie bei vielen anderen Polysaccharid-Biosynthesen ein Lipoid ist. Dieses wird im ersten Schritt der Biosynthese glucosyliert und damit ist der Akzeptor für die Übertragung von Mannose gebildet. Die Glucose wird nicht durch UDP-Glucose übertragen. Wahrscheinlich stellt die mit Chloroform-Methanol extrahierte Glucose-Lipoid-Verbindung den glucosylierten Carrier für die Mannansynthese dar. Es ist aber auch möglich, daß sie nicht Akzeptor für die Mannansynthese ist, sondern daß sie diejenige Verbindung darstellt, von der Glucose auf den Carrier übertragen wird. Lipoidbeteiligung bei Monosaccharidübertragung wurde z.B. auch bei M. luteus (Scher et al., 1968) gefunden.

Das inaktive O9-Mannan-Synthese-System aus Bakterien, die glucosefrei gewachsen waren, kann nicht durch Zugabe von exogener Bactoprenol-Phosphoryl-Glucose rekonstituiert werden (Kanezasaki und Jann, persönliche Mitteilung). Deshalb erwarten wir Bactoprenol-Phosphoryl-Glucose weder als Glucoseüberträger noch als Akzeptor für die Mannansynthese. Bactoprenol-Pyrophosphoryl-Glucose ist als Trägermolekül auszuschließen, da die Biosynthese des O9-Mannans nicht mit Bacitracin hemmbar ist.

Der Akzeptor für die Mannansynthese stellt sich also folgendermaßen dar:

An einem noch nicht identifizierten Carrier-Lipoid, aber wahrscheinlich nicht an Bactoprenol, ist über einen Phospho- oder Pyrophosphodiester Glucose gebunden. Wie die Glucose übertragen wird ist noch nicht bekannt, jedoch scheidet UDP-Glucose als Überträger aus.

Zu b): Auf das Gluco-Lipoid wird Mannose aus GDP-Mannose übertragen. Die bisherigen Untersuchungen geben noch keinen Aufschluß darüber, wie eine Struktur mit Wiederholungseinheiten ohne die vorherige Synthese von Oligosacchariden gebildet wird. Es wäre denkbar, daß bei dem Synthesesystem die verschiedenen spezifischen α -Mannosyltransferasen in einem Multienzymkomplex räumlich so angeordnet sind, daß sie nur nacheinander in einer festgelegten Sequenz Mannose übertragen können.

Zu c): Das O-spezifische Polysaccharid wird in der zytosmatischen Membran auf Core-Lipoid A übertragen (Osborn et al., 1972). Der Mechanismus der Übertragung und des Transports in die äußere Membran ist noch wenig aufgeklärt. Denkbar ist, daß die Polysaccharid-Übertragung durch die Ligase und der Transport unabhängig voneinander und nacheinander erfolgen. Es ist aber auch möglich, daß beide Reaktionen miteinander verbunden sind und daß es sich somit um eine vektorielle Synthese handelt.

11. Material und Methoden

11.1 Bakterien

Bei unseren Untersuchungen verwendeten wir die in Tab. 16 aufgeführten Bakterienstämme:

Stamm-Nr.	Serotyp	Gen-Zustand
F 860	E. coli 09:K29 ⁻ :H ⁻	his ⁻ pmi ⁻
F 988	E. coli 09:K29 ⁻ :H ⁻	his ⁻ pmi ⁻ galU ⁻
F 945	E. coli 08:K27 ⁻ :H ⁻	his ⁻ pmi ⁻

Tab. 16: verwendete Bakterienstämme

Die Phosphomannose - Isomerase-lose Mutante F 860 wurde von Kopmann (1974) aus E. coli F 397 (09:K29⁻:H⁻) isoliert. Die UDP-Glucose-Pyrophosphorylase-lose Mutante F 988 wurde aus F 860 durch Selektion mit 6SR-Phagen isoliert. Für die Phosphomannose-Isomerase-lose Mutante F 945 wurde in F 860 durch Rekombination der rfb-Genort für das 09-Antigen gegen den rfb-Genort für das 08-Antigen aus F 492 08:K27⁻:H⁻ ausgetauscht.

11.2 Phagen

Alle verwendeten Phagen stammen aus der Sammlung des Max-Planck-Instituts für Immunbiologie in Freiburg. Sie sind in Tab. 17 aufgeführt.

Tab.: 17

Phage	Wirtsstamm
Br 2	S. paratyphi B
Br 10	S. paratyphi B
Br 30	S. paratyphi B
FP 1	S. minnesota R5 (Rc); SF 1119
FP 3	S. minnesota R595 (Re); SF 1167
C 21	E. coli B; 2156
6SR	E. coli; F 576
08	E. coli 08:K27 ⁻ ; F 492
09	E. coli 09:K31 ⁻

11.3 Nährmedien

11.3.1 A 3-Medium

Bacto Beef Extract	1.5 g
Bacto Yeast Extract	1.5 g
Bacto Pepton	5 g
Bacto Dextrose	1 g
NaCl	3,5 g
Na ₂ HPO ₄	3,68 g
NaH ₂ PO ₄	1,36 g
Aqua dest. ad	1000 ml

11.3.2 L-Broth mit 0.5 % Glucose

Bacto-Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Glucose	5 g
Aqua dest. ad	1000 ml

mit 4 %iger NaOH auf pH 7.2 eingestellt

11.3.3 Loeb-Medium

Bacto Tryptose	10 g
Hefeextrakt	1 g
NaCl	8 g
Glucose	1 g
Aqua dest. ad	1000 ml

mit 4 %iger NaOH auf pH 7.1 eingestellt. Nach dem Autoklavieren werden 10 ml 2.8 %ige CaCl_2 -Lösung zugesetzt.

11.3.4 Loeb-Agar

Bacto Tryptose	10 g	Glucose	1 g
Hefeextrakt	5 g	NaCl	8 g
Bacto Agar	15 g	Aqua dest. ad	1000 ml

eingestellt auf pH 7.1 mit 4 %iger NaOH

11.4 Seren

11.4.1 Anti-09-Antiserum

Gewinnung aus Kaninchen, die mit hitzegetöteten E. coli 0 9:K 29⁻:H⁻ immunisiert worden waren.

11.4.2 Anti-08-Antiserum

Gewinnung aus Kaninchen, die mit hitzegetöteten E. coli 0 8:K 27⁻:H⁻ immunisiert worden waren.

11.4.3 Normalseren

Wurden aus nicht immunisierten Kaninchen gewonnen.

11.4.4 Anti-Kaninchen-Gamma-Globulin-Serum

Präparat von Difco Laboratories, Detroit Michigan USA.
Das Präparat wurde aus Ziegen nach Immunisierung gegen
Kaninchen-Gamma-Globulin gewonnen.

11.5 Puffer

11.5.1 Tris-Puffer (A)

0.1 M Tris-HCl

pH 7.5

11.5.2 Puffer zur Chromatographie an Sephadex-G-200 (B)

Pyridin : Eisessig : Wasser = 20 : 8 : 1972

11.5.3 Puffer zur Desintegration des TX 100-Extrakts

(C) 4 M Harnstoff
50 mM Tris-HCl
1 mM Dithioerythrol (Calbiochem)
eingestellt auf pH 8

(D) 8 M Harnstoff in (B)

(E) 4 M Guanidin-Hydrochlorid
5 mM Tris-HCl
eingestellt auf pH 8

11.5.4 Puffer für die Affinitätschromatographie (F)

0.005 M Hepes
0.14 M KCl
0.001 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
0.001 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
eingestellt auf pH 7.0, danach wird die Lösung
0.001 M an $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ gemacht.

11.5.5 Puffer für die Chromatographie an DEAE-Cellulose (G)

30.8 g Ammoniumacetat werden in 30 ml Eisessig gelöst.
Diese Lösung wird mit 99 %igem Methanol auf 100 ml verdünnt.

11.6 Laufmittelgemische für die Papierchromatographie

(A) Pyridin:Butanol:Wasser = 4 : 2 : 1 (V/V)

(B) Isopropanol: 1 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ = 3 : 2 (V/V)

Chromatographie auf Whatman Papier Nr. 1 und 3

Dauer: ca. 18 Stunden

11.7 Bestimmung des Einbaues radioaktiver Substanzen

11.7.1 Verwendete radioaktiv markierte Verbindungen

Guanosin-Diphospho- ^{14}C (U)-Mannose: als Ammoniumsalz in wässriger Lösung (pH 6.6; + 2 % Äthanol); 83 mCi/mMol, (Amersham Buchler).

^{14}C -(U)-D-Glucose in 90 % Äthanol 1 - 5 mCi/mMol

(New England Nuclear Corp. = NEN)

D-(1- ^3H)-Glucose in 90 % Äthanol 5 -15 Ci/mMol

(NEN)

11.7.2 Gerät:

Packard-Tri-Carb-Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer (Modell 3390)

11.7.3 Szintillationsflüssigkeit

12 g PPO (2.5-Diphenyloxazid, Fa. C. Roth)

1 l Triton X 114

3 l Xylol

0.2 l Wasser

11.7.4 Vorbereitung der Proben und Messung

a) Radioaktivität auf Papier: Der 3 - 5 cm breite Streifen wurde quer zur Laufrichtung in 1 cm breite Streifen geschnitten. Jeder dieser kleinen Streifen wurde in einem Packard-gläschen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit überschichtet. Danach folgte die Auszählung im Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer.

b) Radioaktivität in Lösung: Wässrige Lösungen (bis 1 ml) konnten bei neutralem, bzw. sauren pH-Wert direkt mit je 10 ml Szintillationsflüssigkeit gemischt und danach im Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer ausgezählt werden. Organische Lösungsmittel wurden vorher evaporiert.

c) Radioaktivität auf Membranfilter: Membranfilter wurden mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit überschichtet und kräftig geschüttelt. Nach etwa 30 Minuten konnten im Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer konstante Werte gemessen werden.

d) Radioaktivität im Polyacrylamid-Gel: Das Gel wurde in 2 mm dicke Scheiben zerschnitten. Jede Scheibe wurde 2 Stunden lang mit 0.5 ml 2 N HCl bei 100°C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde mit den Polyacrylamidresten in 10 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben und dann im Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer ausgezählt.

10.8 Herstellung von Enzympräparationen

10.8.1 EDTA-Präparationen

Die Bakterien werden in einer 100 ml Overnightkultur in die stationäre Wachstums-Phase gezüchtet. Am Morgen werden sie in einer 1 l-Schüttelkultur 3 - 4 Stunden bei 37°C weiterge-

züchtet, sie sind dann in der späten logarithmischen Wachstumsphase. Sie werden bei 4°C abzentrifugiert und in einem Puffer aufgenommen, der 15 mMolar an Tris-HCl, 10 mMolar an EDTA und auf pH 8.0 eingestellt ist. Das Volumen beträgt ein Zwanzigstel des Ausgangsvolumen (Robbins, et al., 1964). Portionweise wird die Suspension bei -20°C eingefroren und ist nach 12 Stunden bei -20°C nach dem Auftauen gebrauchsfertig für Inkubationsversuche.

Für die Extraktion mit Triton X 100 wurden EDTA-Präparationen vorher mit Ultraschall behandelt. Bei einem Volumen von 10 ml beschallten wir mit dem Branson Sonifier (Stufe III) 1 Minute, jeweils in 15 Sekunden Intervallen mit 30 Sekunden Pause.

11.8.2 Herstellung von Membranpräparationen

a) Isolierung

Im Prinzip wurde die von Osborn und Mitarbeiter (1972) ausgearbeitete Methode verwendet. Wir ließen die Bakterien in einer Overnightkultur in die stationäre Phase wachsen und verdünnten sie dann im Verhältnis 1 : 10 mit Medium. Als Schüttelkultur wuchsen sie bei 37°C nach 3 bis 4 Stunden bis in die späte logarithmische Phase. Die optische Dichte bei 600 nm betrug dann ungefähr 1.0. Bei 4°C wurden die Bakterien abzentrifugiert und die Reste des Überstands entfernt. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Die abzentrifugierten Bakterien wurden in einer kalten Rohrzuckerlösung (0.75 M, 10 M Tris-HCl pH 7.8) suspendiert. Das Volumen der Lösung wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$V = 0.07 \times E_{600 \text{ nm}} \times \text{ml Schüttelkultur}$$

Nach 2 Minuten Rühren wurde Lysozym zugesetzt (75 µg/ml Suspension) und weitere 2 Minuten bei 4°C gerührt.

Anschließend folgte die Zugabe von kalter 1.5 mM EDTA-Lösung (pH 7.5). Hiervon wurde die doppelte Menge der vorliegenden Suspension verwendet. Die Zugabe erfolgte mit gleichmäßiger Tropfgeschwindigkeit und unter der Flüssigkeitsoberfläche in einem Zeitraum von 8 - 10 Minuten. Dabei wurde vorsichtig gerührt.

Die Suspension wurde danach mit dem Branson Sonifier (Stufe III) beschallt. Die Dauer der Beschallung richtete sich nach dem Volumen der Suspension: bei 30 ml 45 Sekunden, bei 160 ml 3.5 Minuten; jeweils in 15-Sekunden-Intervallen mit 30 Sekunden Pause. Danach wurden ganze Zellen, Murein und ganze Sphäroplasten 25 Min. bei 2000 g abzentrifugiert. Der Überstand enthielt die Membranvesikel, die durch Ultrazentrifugation daraus gewonnen werden konnten (60 Min. bei 300 000 g).

Wenn das Sediment für Inkubationsversuche verwendet werden sollte, so wurde es in 0.1 M Tris-HCL resuspendiert und erneut ultrazentrifugiert. Dann wurde es im gleichen Puffer aufgenommen und portionsweise eingefroren. Sollten die Membranen aufgetrennt werden, so wurde das Sediment in einer 0.25 M Rohrzuckerlösung (3.3 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA pH 7.5) aufgenommen und darin nochmals ultrazentrifugiert. Für die Membrantrennung wurde es in 1 ml einer 25 %igen Rohrzuckerlösung (w/w, 5 mM EDTA, pH 7.5) aufgenommen und auf den Gradienten geschichtet.

b) Auftrennung in äußere und zytoplasmatische Membran

Das Membrangemisch wurde durch isopyknische Rohrzucker-Gradienten-Zentrifugation aufgetrennt. Dies geschah durch Ultrazentrifugation über 16 Stunden bei 25 000 rpm und 4°C im SW 27-Rotor.

Vorbereitung der Gradienten: in den großen Gehängen (Totalvolumen: 38.5 ml) wurden 2 ml einer 55prozentigen Rohrzucker-Lösung vorgelegt und darüber in der Reihenfolge der

abnehmenden Dichte jeweils 7 ml einer Lösung, die 50, 45, 40, 35 und 30 % Rohrzucker (w/w) enthielt, geschichtet. Alle Zuckerlösungen waren 5 mM an EDTA (pH 7.5). In den kleinen Gehängen betrugen die Volumina 0.5 ml 55prozentige Sucrose und 5 x 3.1 ml der anderen Lösungen.

Auf die vorbereiteten Gradienten wurde vorsichtig die aufzutrennende Suspension gegeben: bis 25 mg Protein pro Gradient (große Gehänge) bzw. bis 10 mg Protein (kleine Gehänge). Zur Isolierung der erhaltenen Banden wurden die Nitrocellulose-Hülsen an ihren Spitzen eingestochen. Die austropfende Lösung wurde in Fraktionen gesammelt. Die Verteilung des Membranmaterials wurde in den Fraktionen durch Messung der optischen Dichte bei 280 nm bzw. (wenn möglich) durch Messung der radioaktiven Markierung festgestellt.

Die zu einer Bande gehörenden Fraktionen wurden gesammelt und nach Zusatz von Tris-Puffer A 60 Min. ultrazentrifugiert (300 000 g). Nach Entfernung des Oberstandes wurde das Sediment portionsweise eingefroren.

11.9 In vitro-Inkubationsansatz

11.9.1 Analytisch

30 µl Membrangemisch (ca. 0.3 mg Protein) werden mit 65 µl Tris-Puffer A verdünnt und mit 5 µl GDP-¹⁴C-Mannoselösung 4 mM (ca. 100 000 cpm) 30 Min. bei 37°C inkubiert. Abbruch der Reaktion kann erfolgen durch Zufügen des gleichen Volumens an Phenol bei anschließender Phenol-Wasser-Extraktion, durch Zugabe von organischen Lösungsmitteln bei anschließender Extraktion oder durch Zugabe von Desintegrationslösung (s. Kap. 11.13.1) bei anschließender SDS-Gelelektrophorese.

11.9.2 Präparativ zur Gewinnung von Produkt

0.5 ml Membrangemisch (5 mg Protein) werden mit 0.5 ml Puffer A verdünnt und mit 50 μ l GDP- 14 C-Mannoselösung 4 mM (ca. 10^6 cpm) 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion kann in 45 % Phenol, in 0.01 N HCl, in 0.01 N H₂SO₄ oder durch Abkühlen und Entfernen des Substrats durch Ultrazentrifugation (1 Stunde, 100 000 g) gestoppt werden. Im letzten Fall werden die Membranen noch einmal mit Puffer gewaschen und dann in 0.5 ml Tris-Puffer A suspendiert. Man erhält so "markierte Membranen".

11.10. Produktkontrolle

11.10.1 Phenol-Wasser-Extraktion im Mikromaßstab

Der in vitro Inkubationsansatz mit dem Gesamtvolumen von 100 μ l wird mit der gleichen Menge 90 % Phenol versetzt. Die Mischung wird unter Umschütteln 10 Minuten auf 65°C erwärmt und dann im Eisbad abgekühlt. Durch Zentrifugation werden die Phasen getrennt. Von der wässrigen Phase, in der sich das Polymere befindet, wird ein Aliquot von 50 μ l entnommen und auf einen Streifen Whatmann Nr. 1 Chromatographie-Papier auf einen Startfleck von 4 cm Breite und 2 cm Länge aufgetragen. Im Laufmittelgemisch B wird 18 Stunden lang absteigend chromatographiert. Anschließend wird die Radioaktivität auf dem Startfleck nach 11.7.4 a bestimmt.

11.10.2 Präzipitation mit Essigsäure

Das Inkubationsgemisch wird mit dem gleichen Volumen 10 %iger Essigsäure präzipitiert und durch ein Membranfilter der Porengröße 0.45 (Sartorius Typ 11306) abgesaugt. Das Filter wird noch dreimal mit je 2 ml 5 %iger Essigsäure gewaschen und anschließend wird die Radioaktivität auf dem Filter nach 11.7.4 c bestimmt.

11.11 Isolierung des Produktes durch Phenol-Wasser-Extraktion bei 65°C

Markierte Membranen werden mit dem gleichen Volumen an 90 % Phenol versetzt. Nach Erwärmung auf 65 - 68°C mischen sich die Phasen vollständig und das Reaktionsgemisch bleibt unter gelegentlichem Umschütteln 10 Min. bei dieser Temperatur. Anschließend wird im Eisbad abgekühlt und durch Zentrifugation in der Laborzentrifuge werden die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird vorsichtig abgenommen und die Phenol-Phase erneut mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt, erwärmt und wieder von Phenol abgetrennt. Die vereinigten wässrigen Phasen werden 3 - 6 mal mit Äther-Petroläther (1 : 1) zur Entfernung des im Wasser gelösten Phenols ausgeschüttelt. Der wässrige Extrakt wird lyophilisiert und kann dann durch Säulenchromatographie weiter gereinigt werden.

11.12 Reinigung des Produktes durch Gelchromatographie

11.12.1 Abgespaltenes Produkt

Mannan, welches durch Spaltung mit Säure oder durch Extraktion mit 45 % wässrigem Phenol bei 65°C von der Membran freigesetzt worden war, wurde in dest. Wasser gelöst. In einem Volumen von 0.5 bis 1 ml wurde es auf eine Sephadex G 200-Säule aufgetragen ($V_0 = 58.3$ ml, $V_0 + V_E = 159$ ml). Mit Puffer B wurde eluiert und Fraktionen von 1.8 ml wurden bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 10.8 ml/Std. aufgefangen. Die Radioaktivität der Fraktionen wurde gemessen und die zum Produkt gehörenden Fraktionen gesammelt und lyophilisiert.

11.12.2 An den Carrier gebundenes Produkt

An den Carrier gebundenes Mannan wurde zur Abtrennung von Substrat (im Inkubationsansatz) oder Phenol (nach Phenol-Wasser-Extraktion bei 4°C) über Sephadex G 50 chromatographiert. Das Material wurde in 0.5 ml Wasser auf eine Säule ($V_0 = 26$ ml, $V_0 + V_E = 75$ ml) aufgetragen. Mit bidestilliertem Wasser wurde eluiert und bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 13,2 ml/Std. wurden Fraktionen von 1.1 ml aufgefangen. Die Radioaktivität der Fraktionen wurde gemessen und die entsprechenden Fraktionen gesammelt.

11.13 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

11.13.1 Desintegrationssystem

- a) Desintegrationslösung: 400 ml SDS (Roth)
3 g Rohrzucker
264 mg Dithioerythrol (Calbiochem)
10 ml Tris-HCl/1 mM EDTA pH 8
ad 10 ml
- b) Markierungslösung: 20 mg Pyronin (Serva) in 100 ml
10 mM Tris-HCl/1 mM EDTA pH 8
- c) Ein Teil der zu untersuchenden Probe wurde mit zwei Teilen Desintegrationslösung und 5 µl Markierungslösung pro Gel gemischt und 5 Min. auf 100°C erhitzt. Nach dem Abkühlen konnte die Probe auf die Geloberfläche aufgetragen werden.

11.13.2 Die Gelelektrophorese

a) Zusammensetzung der Gele (pH 7.4)

- 40 mM Tris
- 20 mM Na-Acetat
- 2 mM EDTA (Na_2 -Salz)

35 mM SDS (= 1 %)

5.6 % Acrylsäureamid (Serva)

0.21 % N,N'-Methylen-Bis-Acrylsäureamid (Serva)

0.15 % Ammoniumperoxodisulfat (Serva)

0.025 % TEMED (N,N,N', N'-Tetramethyläthylendiamin)
(Serva)

Ein Gelröhrchen (0.5 x 10 cm) faßte ca. 2 ml des beschriebenen wässrigen Polymerisationsgemisches. Die Polymerisation dauerte mindestens 1 Stunde. Das Austrocknen der Geloberflächen wurde durch Oberschichten mit Wasser verhindert.

b) Zusammensetzung des Elektrophorese-Puffers

40 mM Tris

20 mM Na-Acetat

2 mM EDTA

35 mM SDS (= 1 %)

Die Zusammensetzung des Puffers im oberen und im unteren Puffer-Reservoir war gleich.

c) Bedingungen für die Elektrophorese

Pro Gel wurden maximal 250 µg Protein zur Auftrennung eingesetzt. Die Elektrophorese wurde mit 5 mA pro Gel betrieben, bis die Front (Pyronin G) 7.5 - 8 cm weit gewandert war.

11.13.3 Auswertung der Gele

a) Proteinanfärbung im Gel

Nach dem Lauf wurden die Gele aus den Röhrchen herausgenommen. In einer wässrigen Lösung (Coomassie I), die 31.5 % Isopropanol, 12.5 % Eisessig und 625 mg/l Coomassie Brilliant Blue G 250 (Serva) enthielt, wurden sie fixiert und angefärbt.

Dieser Vorgang dauerte mindestens 6 Stunden. Farbstoff, der nicht spezifisch an Protein gebunden war, ließ sich anschließend eluieren. Dazu mußten die Gele jeweils mindestens 6 Stunden lang in folgende Lösungen gelegt werden:

1. Coomassie II, wässrige Lösung mit 12.5 % Isopropanol, 12.5 % Eisessig und 62.5 mg/l Coomassie Brilliant Blue;
2. Coomassie III: 31.5 mg Coomassie Brilliant Blue pro Liter 10-prozentige Essigsäure;
3. Entfärber: Methanol/10prozentige Essigsäure (2 : 3);
4. 10prozentige Essigsäure.

Die blau gefärbten Gele wurden fotografiert.

b) Radioaktivität

Die Messung der Radioaktivität im Gel ist in 11.7.4 d beschrieben.

c) Messung der Radioaktivität über dem Gel

Vor dem Lauf wurde über das obere Ende des Gelröhrchens ein Dialyseschlauchstück geschoben (0.8 x 3 cm). Wenn das Gelröhrchen sich in der Elektrophorese-Vorrichtung befand, ragte das Schlauchstück über die Flüssigkeitsoberfläche hinaus. Es wurde mit Elektrophoresepuffer bis zum Flüssigkeitsspiegel der oberen Kammer aufgefüllt und das zur Auftrennung bestimmte Gemisch wurde auf die Geloberfläche unterschichtet. Nach dem Lauf konnte die im Dialyseschlauch befindliche Puffermenge direkt abgesaugt und ausgemessen werden.

11.13.4 Präparative Gelelektrophorese

Die präparative Gelelektrophorese wurde an der gleichen Apparatur durchgeführt wie die analytische Gelelektrophorese. Alle verwendeten Lösungen und die Gele wurden aus reinsten Reagentien und bidestilliertem Wasser frisch hergestellt. Acrylamid und Bismethylenacrylamid wurden vorher folgendermaßen umkristallisiert:

- a) 70 g Acrylamid wurden in 1 l Chloroform bei 50°C gelöst und heiß filtriert. Die Kristalle bildeten sich bei langsamem Abkühlen auf -20°C und wurden dann in der Kälte filtriert, mit Chloroform gewaschen und getrocknet.
- b) 10 g Bismethylenacrylamid wurden mit 1 l Aceton bei 40°C gelöst und heiß filtriert. Nachdem die Lösung auf -20°C abgekühlt war, wurden die Kristalle in der Kälte durch Zentrifugation gewonnen und mit Aceton gewaschen.

Es wurde ein Lauf mit vier Gelen durchgeführt. In allen Gelen wanderte die Pyroninbande genau gleich weit. Pro Gel wurden 20 µl (10 000 cpm) des bei der Affinitätschromatographie eluierten radioaktiven Materials (Mannan an den Carrier gebunden) eingesetzt. Nach dem Lauf wurde in einem Gel das Radioaktivitätsprofil nach 11.7.4 d bestimmt. Aus den drei anderen Gelen wurden die Scheibchen, die dem Radioaktivitätspeak im Leitgel entsprachen, mit 4 ml bidestilliertem Wasser 12 Stunden bei 4°C geschüttelt. Von dem wässrigen Eluat wurden 10 000 cpm lyophilisiert und zur Aminosäuren-Analyse eingesetzt.

11.14 Extraktion des an den Carrier gebundenen Mannans

11.14.1 Extraktion mit Triton X 100

a) Extraktion

Extraktionslösung 37 mM Tris-HCl
 1 mM Dithioerythrol
 1 mM MgCl₂
 0.1 % TX 100
 eingestellt auf pH 8.0

100 µl Membranen (ca. 1 mg Protein) werden mit 6 ml Extraktionslösung 30 Minuten bei 20°C unter häufigem Schütteln extrahiert. Nach Ultrazentrifugation (1 Stunde, 100 000 g) wird der Oberstand im Amicon-Ultrafiltrationsgerät (Modell 8 MC) über einer UM2-Membran auf 500 µl eingeengt.

b) Desintegration des Triton X 100-Extraktes

Zur weiteren Desintegration und Auftrennung wurden 500 µl TX 100-Extrakt mit der gleichen Menge doppelt konzentriertem Puffer C,D, oder E gemischt und dann im Amicon-Ultrafiltrationsgerät (UM2 Membran) auf 500 µl eingeengt. Diese Lösung wurde auf eine Biogel A5m-Säule aufgetragen (2 cm x 46 cm, $V_0 = 32.3$ ml) und mit dem entsprechenden Puffer (C,D, oder E) eluiert. Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 16.3 ml/Std. wurden Fraktionen von 1.35 ml aufgefangen. Die Radioaktivität wurde in Aliquots von 50 µl gemessen und die Proteinkonzentration wurde bei 280 nm bestimmt.

c) Entfernung von Triton X 100

Die Entfernung von Triton X 100 wurde nach einer Methode von Frasch (1976) durchgeführt. Der TX 100-Extrakt wird mit Äthylenglycol (Endkonzentration 30 %) und Äthanol (Endkonzentration 10 %) gemischt. Die Mischung wird im Amicon-Ultrafiltrationsgerät über einer UM2-Membran filtriert und dreimal mit je 2 ml 0.9 % NaCl-Lösung gewaschen. Danach wurde die Lösung in 500 µl 0.9 % NaCl-Lösung aufgenommen. Diese Lösung wurde zum Antigenbindungstest eingesetzt.

11.14.2 Phenol-Wasser-Extraktion bei 4°C

100 µl markierte Membranen werden mit 100 µl Tris-Puffer A und 200 µl Phenol 90 % zwei Stunden bei 4°C unter gelegentlichem Umschütteln extrahiert. Durch Zentrifugation werden die Phasen

getrennt. Die Phenol-Phase wird mit 100 μ l Tris-Puffer A gewaschen und die vereinigten wässrigen Phasen werden 3 mal mit Äther-Petroläther (1 : 1) zur Entfernung des Phenols ausgeschüttelt. Der wässrige Extrakt wird lyophilisiert und kann durch Chromatographie an Sephadex G 50 (s. Kap. 11.12.2) oder an Concanavalin A-Sepharose 4 B (s. Kap. 11.15) gereinigt werden.

11.15 Affinitätschromatographie

Zur Affinitätschromatographie an Concanavalin A wurde Concanavalin A kovalent gebunden an Sepharose 4 B (Pharmacia) verwendet. 100 μ l (300 000 cpm) der Wasserphase der kalten Phenol-Wasser-Extraktion (11.14.2) wurden auf die mit 20 ml Puffer F gewaschene Säule (Pasteurpipette $v = 2$ ml) aufgetragen. Es wurde dann nacheinander mit Puffer F, Puffer F mit 0.05 % TX 100 und Puffer F mit 0.1 M α -Methylmannosid (jeweils 10 ml) eluiert. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 6 ml/Std. und es wurden Fraktionen von 1 ml gesammelt. Die Radioaktivität der Fraktionen wurde in Aliquots von 50 μ l bestimmt. Die Fraktionen, die das radioaktive Material enthielten, wurden vereinigt und durch Ultrafiltration (UM2-Membran) auf 500 μ l eingengt.

11.16 Aminosäureanalyse

Die Aminosäureanalyse der gereinigten Carrier-Mannan-Verbindung wurde mit einem Beckmann Aminosäuren-Analysator (Modell 120 b) durchgeführt. Für die Analyse wurden dem bei der präparativen Gelelektrophorese eluierten Material (10 000 cpm) 10 nMol Norleucin als interner Standard zugegeben. Die Probe wurde 24 Stunden bei 100°C in 1 ml 6 N HCl und 0.21 M Dimethylsulfoxid (Spencer und Wold, 1969) in einem zugeschmolzenen Röhrchen hydrolysiert. Danach wurde die Salz-

säure am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand in 1,1 ml Citratpuffer pH 2.2 aufgenommen und jeweils 0.5 ml der erhaltenen Lösung auf die saure, bzw. basische Säule aufgetragen. Die Trennung erfolgte unter Standardbedingungen und die graphische Aufzeichnung der Aminosäurenzusammensetzung mit einem Beckmann 125 Integrator. Cystein wurde unter diesen Bedingungen als Cysteinsäure erfaßt. Die Aminosäurenanalysen wurden von R. Warth (Max-Planck-Institut, Freiburg) durchgeführt.

11.17. Einwirkung von Proteasen

Inkubationsansatz: 80 µl Substratpräparation
40 µl Proteasenlösung (1 mg/ml)
20 µl 0.1 M CaCl_2

Als Substrat wurden markierte Membranen, sowie daraus erhaltene TX 100-Extrakte und Phenol-Wasser-Extrakt (bei 4°C) verwendet. Der Versuch wurde mit den Proteasen Trypsin, Chymotrypsin, Nagarse, Bromelin und Pronase E durchgeführt. Die Reaktionsmischung wurde bei 37°C inkubiert und nach 6, 12 und 24 Stunden wurden je 40 µl entnommen und für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt. Als Vergleich wurde die entsprechende Substratpräparation unter den gleichen Bedingungen, jedoch ohne Protease, inkubiert und in der SDS-Gelelektrophorese untersucht. Das Radioaktivitätsprofil im Gel und die Radioaktivität über dem Gel wurden nach 11.7.4 d und 11.13.3 c bestimmt.

11.18 Isolierung der Mutante F 988

F 860 Bakterien wurden in 9 ml Loeb-Medium gezüchtet. Dieser Kultur wurden 1 ml 6SR-Phagensuspension (Titer ca. $5 \times 10^9/\text{ml}$) zugegeben und danach bis zur Lyse 1 Stunde bei 37°C geschüttelt.

Nach Eintritt der Lyse wurden weitere 2 Stunden bei 37°C geschüttelt und dann auf Loeb-Agar ausplattiert. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C konnten resistente Kolonien isoliert werden, die im Phagentest und biochemisch untersucht wurden.

11.19 Enzymtests

Die Enzymtests wurden wie von Olson et al. (1969) beschrieben durchgeführt.

11.19.1 Test auf UDP-Glucose-Pyrophosphorylase-Aktivität

Die Reaktionsmischung enthielt:

6 ml Puffer (0.05 M Tris-HCl, 0.01 M MgCl₂, 0.001 M EDTA pH 7.5)

100 µl NADP (10 mg/ml)

200 µl UDP-Glucose (0.1 M)

200 µl Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (1 mg/ml)

20 µl Phosphoglucose-Isomerase (2 mg/ml)

Als Enzympräparationen wurden Bakterienextrakte von E. coli F 860 und E. coli F 988 verwendet. Die Bakterien wurden abzentrifugiert, mit Puffer (0.02 M Tris-HCl, 0.002 M EDTA pH 7.5) gewaschen und in 5 ml Puffer suspendiert. Die Suspension wurde mit dem Branson Sonifier (Stufe III) zweimal 30 Sek. mit 1 Min. Pause beschallt und danach 30 Min. bei 15 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde als Enzympräparation für den Test eingesetzt. In einer Küvette wurden 1 ml des Inkubationsgemisches mit 20 µl Enzympräparation unter Schütteln gemischt. Die Vergleichsküvette enthielt statt Bakterienextrakt 20 µl Puffer. Die Extinktionsänderung bei 365 nm wurde jede Minute abgelesen. Nach 5 Minuten wurden 20 µl neutralisierte 0.2 M Natriumpyrophosphat-Lösung zugegeben und die Extinktionsänderung weiter verfolgt.

11.19.2 Test auf Phosphoglucose-Isomerase-Aktivität

Die Reaktionsmischung enthielt:

6 ml Puffer (wie bei 11.19.1)

100 μ l NADP (10 mg/ml)

20 μ l Fructose-6-Phosphat (0.1 M)

20 μ l Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (1 mg/ml)

In einer 0.5 ml Küvette wurden 0.3 ml Reaktionsmischung mit 5 μ l Enzympräparation (wie bei 11.19.1) gemischt. In der Vergleichsküvette waren statt Enzympräparation 5 μ l Puffer zugefügt. Die Zeit für die Absorptionsänderung um 0.1 bei 365 nm und Raumtemperatur wurde gemessen.

11.20 Identifizierung von Glucose am 09-Mannan

F 988 Bakterien wurden 2 Stunden lang als Schüttelkultur in 100 ml L-Broth mit 0.5 % Glucose und 100 μ l ^{14}C -Glucose (1.5×10^6 cpm) gezüchtet. Die daraus nach 11.8.1 hergestellten EDTA-Präparationen inkubierten wir mit 500 μ l 4 mM GDP-Mannose. Nach Zentrifugation wurde das Sediment in 1 ml Tris-Puffer A suspendiert und mit 0.01 N HCl (30 Minuten bei 100°C) wurde das Polysaccharid von der Membran abgespalten. Nach Zentrifugation wurde der Überstand, der das freigesetzte Mannan enthielt, mit NaOH neutralisiert und über Sephadex G 200 gereinigt (11.12.1). Das von der Säule eluierte radioaktive Material wurde mit 1 N HCl 2 Stunden bei 100°C hydrolysiert und danach lyophilisiert. Die mit wenig Wasser aufgenommene Probe wurde mit ^3H -Glucose (ca. 10 000 cpm) als innerer Standard versetzt und auf Papierstreifen von 4 cm Breite und 50 cm Länge aufgetragen. Nach der Chromatographie in Laufmittelgemisch A wurde die Radioaktivität nach 11.7.4 a bestimmt. In dem Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer konnten ^3H und ^{14}C nebeneinander ausgezählt werden.

11.21 Extraktion und Identifizierung lipoidgebundener Glucose

11.21.1 Extraktion

a) Extraktion mit Chloroform-Methanol

200 µl Bakteriensuspension wurden mit 4 ml Chloroform-Methanol (2 : 1) gemischt und unter gelegentlichem Schütteln 10 Minuten lang auf 55°C erwärmt. Nach dem Abkühlen im Eis folgte ein Zusatz von 1 ml 0.9 %iger NaCl-Lösung. Das Extraktionsgemisch wurde 1 Minute geschüttelt und dann bei Raumtemperatur 15 Minuten lang stehen gelassen. Nach Phasentrennung wurde durch ein silikonisiertes Filterpapier (Whatmann 1 PS, 9 cm) genau eine Minute lang filtriert.

b) Extraktion mit Butanol

1 ml Bakteriensuspension wurde mit 1 ml wassergesättigtem Butanol 1 Minute lang geschüttelt und zur Phasentrennung zentrifugiert. Die Butanolphase wurde dann noch zweimal mit je 1 ml Wasser gewaschen. Zur Messung der Radioaktivität kann die Butanolphase direkt mit der Szintillationsflüssigkeit gemischt und ausgezählt werden.

11.21.2 Identifizierung

F 988 Bakterien wurden 2 Stunden lang in Schüttelkultur in 100 ml L-Broth mit 0.5 % Glucose gezüchtet. Die zentrifugierten Bakterien wurden dann in 10 ml L-Broth mit 0.5 % Glucose und 100 µl ^{14}C -Glucose (1.5×10^6 cpm) 5 Minuten lang inkubiert, anschließend zentrifugiert, mit 0.9 %iger NaCl-Lösung gewaschen und in 5 ml 0.9 %iger NaCl-Lösung suspendiert. Nach der Extraktion mit Chloroform-Methanol (2 : 1) wurde das Chloroform evaporiert und die Probe in 1 N HCl 2 Stunden bei 100°C hydrolysiert. Das Hydrolysat

wurde, wie in 10.20, in der Papierchromatographie aufgetrennt und ^{14}C -Glucose neben einem inneren Standard von ^3H -Glucose identifiziert.

11.22 Chromatographie von Lipoiden an DEAE-Cellulose

Die Chromatographie der Lipoidmischung an DEAE-Cellulose wurde wie von Dankert und Mitarbeitern (1966) beschrieben, durchgeführt.

Die DEAE-Cellulose lag in der Acetat-Form vor. Chloroform-Methanol-Extrakt aus F 988 Bakterien, die in 100 ml L-Broth mit 0.5 % Glucose und 100 μl ^{14}C -Glucose (1.5×10^6 cpm) gewachsen waren, wurde, nachdem das Chloroform evaporiert war, in Methanol aufgenommen. Diese Lösung wurde auf die Säule (1 cm x 30 cm) aufgetragen und mit 200 ml 99 %igem Methanol und anschließend mit einem Gradienten von 0 - 0.4 M Ammoniumacetat in 99 %igem Methanol (100 ml Puffer G in 100 ml 99 %igem Methanol) bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 20 ml/Std. eluiert. Es wurden Fraktionen von 3 ml aufgefangen und die Radioaktivität gemessen.

11.23 Rekonstitution des Mannansynthesesystems

11.23.1 Wässrige Suspension des Lipoidextraktes

5 μl EDTA-Präparation aus F 988 Bakterien, die in L-Broth mit 0.5 % Glucose gewachsen waren, wurden mit 5 ml wassergesättigtem Butanol extrahiert (s. Kap. 10.21.1 b). Die Butanolphase wurde im Rotationsverdampfer konzentriert. Wenn das Volumen auf die Hälfte reduziert war, wurde die gleiche Menge Wasser zugefügt. Dieser Vorgang wurde mindestens 5 mal wiederholt. Die somit in eine wässrige Suspension überführte Probe wurde auf 0.5 ml konzentriert und frisch für die Inkubation verwendet.

11.23.2 Membranpräparation

5 ml EDTA-Präparation aus F 988 Bakterien, die in L-Broth ohne Glucose gewachsen waren, wurden mit 0.2 ml 10 %iger Lysozym-Lösung 4 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 0.4 mg DNase, 1 ml 0.5 M Tris-HCl pH 7.5 und 0.5 ml 0.2 M $MgCl_2$ wurde nochmals 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zusatz von 0.1 ml 0.1 M EDTA wurde zur Abtrennung von ganzen Zellen zentrifugiert. Der Oberstand wurde dann 20 Minuten lang bei 18 000 g zentrifugiert und das dabei erhaltene Sediment viermal mit 0.01 M EDTA gewaschen. Zum Schluß wurde das Sediment in 1 ml 0.01 M EDTA aufgenommen.

11.23.3 Integration der Lipoid-Zwischenstufe in die Membran

50 µl Membranpräparation (s. Kap. 11.23.2) wurden jeweils mit 5, 10, 15 und 20 µl in Wasser suspendiertem Butanol-extrakt und 10 µl Wasser 5 mal eingefroren und wieder aufgetaut. Die Proben wurden dann in 10 µl 0.5 M Tris-HCl pH 7.5 mit GDP- ^{14}C -Mannose (0.4 mM, 70 000 cpm) 10 Minuten lang inkubiert und das gebildete radioaktive Produkt wurde nach Präzipitation mit Essigsäure (s. Kap. 11.10.2) gemessen.

11.24 Antigenbindungstest

Getestet wurden das an den Carrier gebundene in vitro Produkt, welches nach Inkubation von Membranen oder daraus hergestelltem TX 100-Extrakt erhalten wurde, und das vom Carrier durch Säurespaltung oder Phenol-Wasser-Extraktion bei 65°C abgespaltene in vitro Produkt.

11.24.1 Vorbereitung der Proben

a) 100 μ l markierte Membranen (50 000 cpm) wurden mit TX 100 extrahiert und anschließend wurde TX 100 entfernt (s. Kap. 11.14.1 c). Von der in 0.9 %igem NaCl aufgenommenen Probe enthielten 50 μ l etwa 10 000 cpm.

b) 1 ml TX 100-Extrakt aus unmarkierten Membranen wurde mit GDP- 14 C-Mannose (4 mM, 500 000 cpm) inkubiert. Nach der Entfernung von TX 100 (s. Kap. 11.14.1 c) wurde das an den Carrier gebundene Produkt zur Entfernung von Substrat über Sephadex G 50 (s. Kap. 11.12.2) chromatographiert und in 0.9 %iger NaCl-Lösung aufgenommen (8000 cpm/50 μ l).

c) 100 μ l der nach a) vorbereiteten Probe wurden mit 0.01 N H_2SO_4 30 Minuten bei 100°C inkubiert. Nach Neutralisation mit NaOH wurde ultrazentrifugiert (1 Stunde, 100 000 g). Das Produkt im Überstand wurde dann durch Chromatographie an Sephadex G 200 gereinigt (s. Kap. 10.12) und in 0.9 %iger NaCl-Lösung aufgenommen (5000 cpm/50 μ l).

d) Das mit Phenol-Wasser bei 65°C extrahierte Produkt (s. Kap. 11.11) wurde über Sephadex G 200 gereinigt (s. Kap. 11.12.1) und in 0.9 %iger NaCl-Lösung aufgenommen. 50 μ l enthielten etwa 10 000 cpm.

11.24.2 Durchführung des Tests

50 μ l der Antigenlösung (5000 - 10 000 cpm) wurden mit 50 μ l anti 09-Antiserum, bzw. anti 08-Antiserum 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Zum Vergleich wurde eine Probe mit Normalserum unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 2 Tage lang bei 4°C aufbewahrt. Danach setzten wir jeweils 100 μ l Anti-Kaninchen-Gamma-Globulin-Serum (Difco) zu und ließen die Proben nach einstündiger Inkubation bei 37°C wieder zwei Tage bei 4°C stehen. Zum Schluß wurde

in einem SW 50.1 Rotor 30 Minuten bei 30 000 rpm ultrazentri-
fugiert. Die Radioaktivität im Überstand wurde gemessen. Das
Sediment wurde einmal mit 0.9 %iger NaCl-Lösung gewaschen und
danach die im Sediment enthaltene Radioaktivität gemessen.

12. Literaturangaben

ALAM, S.S., BARR, R.M., RICHARDS, J.B. HEMMING, F.W.,
Biochem. Jour. 121, 19 (1971)

ANDERSON, J.S., MATSUHASHI, M., HASKIN, M., STROMINGER, J.L.,
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 53, 881 (1965)

ARNON, R., NEURATH, H., Immunochemistry 7, 241 (1970)

BADDILEY, J., Fed.Proc., Fed.Amer.Soc.Exp.Biol. 21, 1084 (1962)

BADDILEY, J., Proc.Roy.Soc.Ser. B 170, 331 (1968)

BEHRENS, N.H., CABIB, K., Journ.Biol.Chem. 243, 502 (1968)

BEHRENS, N.H., PARODI, A.J., LELOIR, L.F., Proc.Natl. Acad.Sc.
USA 68, 2857 (1971)

BENDE, H., Chemie in unserer Zeit 8, 17 (1974)

BLADEN, H.A., MERGENHAGEN, S.E., Journ.Bact. 88, 1482 (1964)

BRAUN, V., in "Bacterial Lipopolysaccharides" (E.H. Kass and
S.M. Wolff eds.) The University of Chicago Press (1973)

BRAUN, V., HANTKE, K., Ann.Rev.Biochem. 43, 89 (1974)

BRAY, D., ROBBINS, P.W., Biochem.Biophys.Res.Comm. 28, 334
(1967)

BURGER, M.M., GLASER, L., Journ.Biol.Chem. 239, 3168 (1964)

COSTERTON, J.W., INGRAM, J.M., CHENG, K.-J., Bact.Rev. 38,
87 (1974)

CUATRECASAS, P., Journ.Biol.Chem. 247, 1980 (1972)

CUATRECASAS, P., Advanc. in Enzymol. 36, 29 (1972 a)

CURVALL, M., LINDBERG, B., LÖNNGREN, J., NIMMICH, W.,
Acta chem. Scand. 27, 2645 (1973)

DANKERT, M., WRIGHT, A., KELLEY, W.S., ROBBINS, P.W.,
Arch. of Biochem. and Biophys. 116, 425 (1966)

DE LUCA, L., Biochem. Biophys. Res.Comm. 41, 615 (1970)

DOWHAN, W., WICHNER, W.T., KENNEDY, E.P., Journ.Biol.Chem.
249, 3079 (1974)

- EDSTROM, R.D., HEATH, E., Journ.Biol.Chem. 242, 3581 (1967)
- FEHMEL, F., FEIGE, U., NIEMANN, H., STIRM, S.; Journ. of Virology 16, 591 (1975)
- FIEDLER, F., GLASER, L., Journ.Biol.Chem. 249, 2684 (1974)
- FLEMMING, H.C., Dissertation, Freiburg 1976
- FLEMMING, H.C., JANN, K., Eur.Journ.Biochem. 83, 47 (1978)
- FRASCH, C.E., Dialog Nr. 13, publ. by Amicon BV. Oosterhout (N.B.) Holland (1976)
- GHUYSEN, J.M., STROMINGER, J.L., TIPPER, D.J., Comprehensive Biochem. 26 A, 53 (1968)
- GINSBURG, V., Adv. Enzymol. 26, 35 (1964)
- GOLDSTEIN, J.J., HOLLERMANN, C.E., MERRICK, J.M., Biochem.Biophys.Acta 97, 68 (1965)
- HASE, S., RIETSCHER, E.T., Eur. Journ.Biochem. 63, 101 (1976)
- HEIDELBERGER, M., Fortschritte der Chem.org. Naturstoffe, 18, 503 (1960)
- HEIDELBERGER, M., NIMMICH, W., Immunochemistry 13, 67 (1976)
- HELENIUS, A., SIMONS, K., Biochem.Biophys.Acta 415, 29 (1975)
- HELLERQVIST, A.G., LINDBERG, B., SVENSSON, S., HOLME, T., LINDBERG, A.A., Carbohydrate Research 8, 43 (1968)
- HEMMING, F.W., in "Medical and Technical Publishing" (MTP) International Reviews Serie of Science, Biochemistry, Series 1, Vol. 4, S. 39, Butterworth London (1974)
- HEPTINSTALL, S., ARCHIBALD, A.R., BADDILEY, J., Nature 225, 519, (1970)
- HIGASHI, Y., STROMINGER, J.L., SWEELEY, C.C., Proc.Natl. Acad.Sci. USA 57, 1878 (1967)
- HIRSCHFELD, J., Science Tools 7, 18 (1960)
- HOWARD, J.G., GLYNN, A.A., Immunology 20, 767 (1971)
- HUNGERER, D., JANN, K., JANN, B., ØRSKOV, F., ØRSKOV, J., Eur.Journ.Biochem. 2, 115 (1967)

JANN, B., JANN, K., Schmidt, G., ØRSKOV, F., ØRSKOV, J.,
Eur.Journ.Biochem. 23, 515 (1971)

JANN, K., Westphal, O., in "The Antigens" (M. Sela ed.)
Vol. 3, S. 1, Academic Press, New York, London (1975)

JANN, B., RESKE, K., JANN, K., Eur.Journ.Biochem. 60,
239 (1975)

JANN, K., JANN, B., Surface Carbohydrates of the Prokaryotic
Cell (J.W. Sutherland ed.) Academic Press New York, London
(1977)

JANN, K., JANN, B., WINTER, V., WOLF-ULLISCH, C.,
Veröffentlichung in Vorbereitung (1978)

KALB, A.J., LEVITZKI, A., Biochem. Journ. 109, 669 (1968)

KAMIO, Y., NIKAIDO, H., Biochemistry 15, 2561 (1976)

KANEGASAKI, S., Wright, A., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 67,
951 (1970)

KAUFFMANN, F., Die Bakteriologie der Salmonella Species
Munksgaard Copenhagen (1961)

KENT, J.L., OSBORN, M.J., Biochemistry 7, 4419 (1968)

KNOX, K.W., WICKEN, A.J., Bact.Reviews 37, 215 (1973)

KOPMANN, H.J., Dissertation, Freiburg (1974)

KOPMANN, H.J., JANN, K., Eur.Journ.Biochem. 60, 587 (1975)

LAHAV, M., CHIU, T.H., LENNARZ, W.J., Journ.Biol.Chem.
244, 5890 (1969)

LE-BA NHAN, JANN, K., JANN, B., ØRSKOV, F., ØRSKOV, J.,
Eur.Journ.Biochem. 21, 226 (1971)

LELOIR, L.F., Biochem. Journ. 91, 1 (1964)

LENNARZ, W.J., SCHER, M.G., Biochem.Biophys.Acta 265, 417
(1972)

LINDBERG, B., LÖNNGREN, J., NIMMICH, W., Acta Chem.Scand.
26, 2231 (1972)

LIS, H., SHARON, N., Ann.Reviews.Biochem. 42, 541 (1973)

LOWRY, O.H., Rosebrough, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.,
Journ.Biol.Chem. 193, 265 (1951)

- LODERITZ, O., WESTPHAL, O., SIEVERS, K., KRÜGER, E.,
NETER, E., BRAUN, O.H., *Biochem.Z.* 330, 21 (1957)
- LODERITZ, O., STAUB, A.M., WESTPHAL, O., *Bact.Reviews* 30,
192 (1966)
- LODERITZ, O., *Angew.Chemie* 82, 708 (1970)
- LODERITZ, O., WESTPHAL, O., STAUB, A.M., NIKAIIDO, H.,
in "Microbial Toxins" (G. Weinbaum, S. Kadis and S.J. Ajl eds.)
Vol. 4, S. 145, Academic Press New York, London (1971)
- LODERITZ, O., GALANOS, C., LEHMANN, V., NURMINEN, M.,
RIETSCHEL, E.T., ROSENFELDER, G., SIMON, M., WESTPHAL, O.,
in "Bacterial Lipopolysaccharides" (K. Kass and S.M. Wolff
eds.) Univ. of Chicago Press, S. 9 (1973)
- LURIA, S.E., BURROUS, J.W., *Journ.Bact.* 74, 461 (1957)
- MAKELA, P.H., Stocker, B.A.D., *Annual Reviews of Genetics*
3, 291 (1969)
- MAKELA, P.H., JAKKOLA, M., LODERITZ, O., *Journ.Gen.Microb.*
60, 91 (1970)
- MINDEN, P., ANTHONY, B.F., FARR, R.S., *Journ.Immunol.* 102,
832 (1969)
- MINDEN, P., FARR, R.S., in "Handbook of Experimental
Immunology" (D.M. Weir ed.) 2nd ed., 15.1
Blackwell Oxford (1973)
- MOHLRADT, P., *Biologie in unserer Zeit* 2, 33 (1975)
- NIKAIDO, H., *Advanc.Enzymol.* 31, 77 (1968)
- NIKAIDO, H., in "Bacterial Membranes and Walls" (L. Leive ed.)
S. 131 Marcel Dekker Inc., New York (1973)
- NORTON, W.T., *Nature* 184, 1144 (1959)
- NOVOTNY, A., *Bacteriol.Reviews* 33, 72 (1969)
- OLSON, A.C., SCHMIDT, G., JANN, K., *Eur.Journ.Biochem.* 11,
376 (1969)
- ØRSKOV, F., ØRSKOV, J., JANN, B., JANN, K., *Acta Pathologica
et Microbiologica Scandinavia, Sect. B* 79, 142 (1971)
- ØRSKOV, J., ØRSKOV, F., JANN, B., JANN, K., *Bact.Reviews* 41,
667 (1977)

OSBORN, M.J., Ann.Rev.Biochem. 38, 501 (1969)

OSBORN, M.J., in "Structure and Funktion of Biological Membranes" (L. Rothfield ed.) S. 343, Acad.Press New York London (1971)

OSBORN, M.J., ROTHFIELD, L., in "Microbial Toxins" (G. Weinbaum, S. Kadis, S.J. Ajl eds.) Acad.Press, New York, London (1971)

OSBORN, M.J., GANDER, J.E., PARISI, E., CARSON, J., Journ.Biol.Chem. 247, 3962 (1972)

OSBORN, M.J., RICK, P.D., LEHMANN, V., RUPPRECHT, E., SINGH, M., Annals of the New York Acad.Sci. 235, 52 (1974)

OUCHTERLONY, Ø. Progr.Allergy 5, 1 (1958)

PAGE, R.J., ANDERSON, J.S., Journ.Biol.Chem. 247, 2471 (1972)

PREHM, P., JANN, K., Journ. of Virol. 19, 940 (1976)

PREHM, P., JANN, B., JANN, K., Eur.Journ.Biochem. 67, 53 (1976)

REES, D.A., Biochem. Journ. 126, 257 (1972)

RESKE, K., Diplomarbeit, Freiburg (1968)

RESKE, K., JANN, K., Eur.Journ.Biochem. 31, 320 (1972)

RICHARDS, J.B., EVANS, P.J., HEMMING, F.W., Biochem. Journ. 124, 957 (1971)

RIETSCHEL, E.T., HASE, S., KING, M.T., REDMOND, J., LEHMANN, V. in "Microbiology" (D. Schlessinger ed.) Am.Soc.Washington D.C. (1976)

ROBBINS, P.W., UCHIDA, T., Biochemistry 1, 323 (1962)

ROBBINS, P.W., WRIGHT, A., BELLOWS, J.L., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 52, 1302 (1964)

ROBBINS, P.W., KELLER, J.M., WRIGHT, A., BERNSTEIN, R.L., Journ.Biol.Chem. 240, 384 (1965)

ROBBINS, P.W., WRIGHT, A., in "Microbial Toxins" (G. Weinbaum, S. Kadis, S.J. Ajl eds.) Vol. IV, S. 351, Acad.Press, New York, London (1971)

ROTHFIELD, L., ROMEO, D., Bacteriol.Reviews 35, 14 (1971)

- ROUSER, G., KRITCHEVSKY, G., HELLER, D., LIEBER, E.,
Journ. of Americ. Oil Chemists' Society 40, 425 (1963)
- RODE, E., MEYER-DELIUS, M., GUNDELACH, M.L., Eur. Journ.
Immunol. 1, 113 (1971)
- SALTON, M.R.J., FREER, J.H., in "Microbial Toxins"
(G. Weinbaum, S. Kadis, S.J. Ajl eds.) Vol. IV, S. 118,
Acad. Press, New York, London (1971)
- SANDERSON, K.E., Bact. Reviews 36, 558 (1972)
- SARVAS, M., NIKAIDO, H., Journ. of Bact. 105, 1063 (1971)
- SCHER, M., LENNARZ, W.J., SWEeley, C.C., Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 59, 1313 (1968)
- SCHMIDT, G., JANN, B., JANN, K., Eur. Journ. Biochem. 16,
382 (1970)
- SCHMIDT, G., MAYER, H., MÄKELÄ, P.H., Journ. Bact. 127,
755 (1976)
- SCHNAITMANN, C.A., Journ. Bact. 108, 553 (1971)
- SCHNAITMANN, C.A., Journ. Bact. 108, 545 (1971 a)
- SELA, M., SCHECHTER, B., SCHECHTER, J., BOREK, F.,
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 32,
537 (1967)
- SHAPIRA, E., ARNON, R., Journ. Biol. Chem. 244, 1026 (1969)
- SHARON, N., LIS, H., Science 177, 949 (1972)
- SIEWERT, G., STROMINGER, J.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57,
767 (1967)
- SIMONS, K., HELENIUS, A., GAROFF, H., Journ. Mol. Biol. 80,
119 (1973)
- SINGER, S.J., NICOLSON, G.L., Science 175, 720 (1972)
- SMIT, J., KAMIO, Y., NIKAIDO, H., Journ. Bact. 124, 942 (1975)
- SPENCER, R.L., WOLD, F., Anal. Biochem. 32, 185 (1969)
- STOCKER, B.A.D., MÄKELÄ, P.H., in "Microbial Toxins"
(G. Weinbaum, S. Kadis, S.J. Ajl, eds.) Vol. IV, S. 369,
Acad. Press, New York, London (1971)

- TANFORD, C., REYNOLDS, J.A., Biochem.Biophys. Acta 457, 113 (1976)
- TANNER, W., JUNG, P., BEHRENS, N.H., FEBS Lett. 16, 245 (1971)
- TAYLOR, A.L., TROTTER, C.D., Bact.Reviews 36, 504 (1972)
- TOMASZ, A., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 59, 86 (1967)
- TOMASZ, A., HOLTJE, J.v., Journ.Bact. 124, 1023 (1975)
- TZAGALOFF, A., PENEFSKY, H.S., in "Methods in Enzymology" (W.B. Jakoby ed.) Vol. 22, S. 219, Acad.Press, New York, London (1971)
- WASSERMANN, R.H., CORRADINO, R.A., Ann.Rew.Biochem. 40, 501 (1971)
- WESTPHAL, O., LUDERITZ, O., BISTER, F., Zeitschrift für Naturforschung 7b, 155 (1952)
- WHEAT, R.W., BERST, M., RUSCHMANN, E., LUDERITZ, O., WESTPHAL, O., Journ.Bact. 94, 1366 (1967)
- WILKINSON, J.F., Bact.Reviews 22, 46 (1958)
- WOLF, C., ELSÄBER-BEILE, U., STIRM, S., DUTTON, G.G.S., BURCHARD, W., Biopolymers, im Druck (1978)
- WRIGHT, A., DANKERT, M., FENNESSEY, P., ROBBINS, P.W., Proc.Natl.Acad.Sci, USA 57 (1967)
- YOUNG, J.D., LEUNG, C.Y., Biochemistry 9, 2755 (1970)

Lebenslauf

13. 2. 1949 geboren als Tochter von Lotte Winter, geb.
Lehmann und Rainer Winter in Markdorf (Bodensee)
- 1955 - 1959 Grundschule in Ohlingen und Badenweiler
- 1959 - 1960 Realschule in Müllheim
- 1960 - 1968 Math.-Nat.-Gymnasium in Müllheim
- Juni 1968 Reifeprüfung
- 1968 - 1970 Apothekenpraktikum in der Frosch-Apotheke in
Lörrach
- Sept. 1970 Pharmazeutisches Vorexamen
- Okt. 1970 - Praktikum in der Klinik-Apotheke von Hadassah
Febr. 1971 in Jerusalem
- 1971 - 1974 Pharmaziestudium an der Universität Freiburg
- April 1974 Pharmazeutisches Staatsexamen
- Jan. 1975 - Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für
Dez. 1977 Immunbiologie in Freiburg unter der Leitung
von Professor Dr. K. Jann

